

DISERTASI

**EFEK ANTITIROSinASE EKSTRAK KOPI ROBUSTA BP-42 TERHADAP
PROSES PIGMENTASI PASCA *SKIN GRAFT*
PADA TIKUS STRAIN *LONG EVANS***



ULFA ELFIAH

**PROGRAM STUDI DOKTOR ILMU KEDOKTERAN
FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA**

2022

**EFEK ANTITIROSinASE EKSTRAK KOPI ROBUSTA BP-42 TERHADAP
PROSES PIGMENTSI PASCA *SKIN GRAFT*
PADA TIKUS STRAIN *LONG EVANS***

DISERTASI

**Untuk memperoleh Gelar Doktor
Dalam Program Studi Doktor Ilmu Kedokteran
Pada Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga**

Oleh:

Ulfa Elfiah

011917017313

**PROGRAM STUDI DOKTOR ILMU KEDOKTERAN
FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA**

2022

Halaman Pengesahan

Disertasi Dengan Judul

EFEK ANTITIRO SINASE EKSTRAK KOPI ROBUSTA BP-42 TERHADAP
PROSES PIGMENTASI PASCA SKIN GRAFT
PADA TIKUS STRAIN *LONG EVANS*

TELAH DIUJI

PADA TANGGAL,2022

Oleh
Promotor

Prof. Dr. David S. Perdanakusuma, dr., Sp.BP-RE(K)

NIP 19600305 1989011002

Kopromotor I

Dr. Iswinarno Doso Saputra, dr., Sp.BP-RE(K)

NIP 196304152016016101

Kopromotor II

Dr. Ir. Misnawi

NIK 111000217

Mengetahui

KPS Ilmu Kedokteran Jenjang Doktor

Prof. Dr. Hendy Hendarto, dr. Sp. OG(K)

NIP 196108172016016101

**Disertasi ini telah diuji dan dinilai
oleh panitia penguji pada Tertutup (Tahap I)
Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga Pada Tanggal ...**

PANITIA PENGUJI DISERTASI

Ketua : Prof. Dr. David S.Perdanakusuma, dr., SpBP-RE(K)

Anggota :

- 1. Dr. Iswinarno Doso Saputra, dr., SpBP-RE(K)**
- 2. Dr.Ir. Misnawi**
- 3. Prof.Dr.Umi Athiyah, MS., Apt**
- 4. Prof.Dr. I Ketut Suidiana, Drs., M.Si**
- 5. Dr.Budi Utomo,dr., M.Kes**
- 6. Dr. M.Yulianto Listiawan, dr., SpKK(K)**

**Diterbitkan dengan Surat Keputusan
Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga
Tentang Panitia Penguji Disertasi
Nomor :
Tanggal :**

Ucapan Terima Kasih

Puji dan syukur penulis haturkan ke Allah SWT, atas segala berkat dan limpahan rahmat-Nya, sehingga penulis dapat menyelesaikan penyusunan disertasi yang berjudul “Efek Antitirosinase Ekstrak Kopi Robusta Bp-42 Terhadap Proses Pigmentasi Pasca Skin Graft Pada Tikus Strain Long Evans”. disertasi ini merupakan persyaratan untuk mencapai gelar strata 3 pada Program Doktorat Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga, prodi Ilmu Kedokteran. Penyelesaian disertasi ini tentunya tidak terlepas dari bantuan dari berbagai pihak sehingga penulis menyampaikan rasa hormat dan terima kasih kepada:

1. Doktor Prof. Dr. Hendy Hendarto, dr.,Sp.OG(K) selaku ketua Program Studi Ilmu Doktor Ilmu Kedokteran, Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga, yang dengan penuh perhatian memberikan masukan, kritik dan saran serta terus mendukung penulis dalam penyelesaian tesis ini.
2. Prof. Dr. David S.Perdanakusuma, dr., SpBP-RE(K), Dr. Iswinarno Doso Saputra, dr., SpBP-RE(K), Dr.Ir. Misnawi selaku dosen pembimbing yang telah memberikan masukan, saran serta bimbingan dalam semua proses penyelesaian disertasi ini.
3. Prof. Dr. Umi Athiyah, MS., Apt, Prof. Dr. I Ketut Suidiana, Drs., M.Si, Dr.Budi Utomo,dr., M.Kes, Dr. M.Yulianto Listiawan, dr., SpKK(K) selaku penguji yang telah memberikan saran yang membangun bagi penulis guna menyempurnakan disertasi ini.
4. PUSLITKOKA Jember melalui penyediaan biji kopi strain BP-42 sehingga penelitian ini berjalan dengan baik.

Penulis menyadari bahwa tulisan ini tidak lepas dari kekurangan. Oleh karena itu penulis mengharapkan kritik dan saran demi peningkatan penulisan berikutnya.

Semoga penelitian ini dapat memberikan manfaat kepada masyarakat dan ilmu pengetahuan.

Surabaya, Desember 2022

Penulis

Summary

Introduction : Skin graft is one of the best options for wound closure. This method is the gold standard for skin burns and large open wounds. However, skin grafts are hyperpigmented and have some limitations. Previous studies have used kojic acid to reduce hyperpigmentation, but there are also reports that kojic acid poses a risk of potential thyroid side effects. Coffee is very abundant in Indonesia, especially in Jember province. One of the best Robusta coffees is BP-42, provided by the Indonesian Coffee and Cacao Research Institute, Jember Regency, East Java. BP-42 coffee has the highest quality grain and organoleptic score compared to other varieties. Coffee is believed to reduce hyperpigmentation due to many significant active compounds found in coffee with anti-tyrosinase activity. However, the anti-tyrosinase activity of BP-42 coffee extract is unknown.

Purpose: Identifying the active substance content of robusta coffee extract strain BP-42. Determining the anti-tyrosinase activity of coffee extract robusta BP-42. Explain the antityrosinase effect of coffee BP-42 on the post-skin-graft pigmentation process

Methods: BP-42 coffee beans was extracted using ethanol by maceration technique. BP-42 coffee active compounds were identified by the Liquid Chromatography Mass Spectrometer (LC MS/MS) and gravimetric method. 30 long evans mice were separated into negative control, positive control (kojic acid), and BP-42 coffee extract groups. Those mice were skin grafted and received the treatment based on group treatment.

Results: BP-42 coffee bean extract had caffeine, hydroquinone, free fatty acid, chlorogenic acid and trigonelline. As expected, the extract exhibited anti-tyrosinase activity in mice. Mice with BP-42 coffee extract showed similar results with positive control group

Conclusion: BP-42 coffee bean extract showed a notable anti-tyrosinase activity, promising to be used as the natural anti-pigmentation candidate.

Ringkasan

Pendahuluan: *Skin graft* adalah salah satu pilihan terbaik untuk penutupan luka. Metode ini adalah standar emas untuk luka bakar kulit dan luka terbuka yang besar. Namun, cangkok kulit memberikan dampak pada terjadinya hiperpigmentasi dan memiliki beberapa keterbatasan. Penelitian sebelumnya telah menggunakan asam kojic untuk mengurangi hiperpigmentasi, tetapi terdapat laporan bahwa asam kojic menimbulkan risiko efek samping tiroid yang potensial.

Kopi sangat melimpah di Indonesia, terutama di provinsi Jember. Salah satu kopi Robusta terbaik adalah BP-42, yang disediakan oleh Pusat Penelitian Kopi dan Kakao Indonesia, Kabupaten Jember, Jawa Timur. Kopi BP-42 memiliki kualitas biji kopi dan skor organoleptik yang paling tinggi dibandingkan dengan varietas lainnya. Kopi dipercaya dapat mengurangi tingkat hiperpigmentasi karena zat aktif dalam kopi memiliki aktivitas anti-tirosinase. Namun, aktivitas anti-tirosinase dari ekstrak kopi BP-42 belum diketahui.

Tujuan: Mengidentifikasi kandungan zat aktif ekstrak kopi robusta strain BP-42. Menentukan aktivitas anti-tirosinase ekstrak kopi robusta BP-42. Menjelaskan efek antityrosinase kopi BP-42 pada proses pigmentasi pasca cangkok kulit

Metode: Biji kopi BP-42 diekstraksi menggunakan etanol dengan teknik maserasi. Senyawa aktif kopi BP-42 diidentifikasi dengan metode Liquid Chromatography Mass Spectrometer (LC MS/MS) dan gravimetri. Sebanyak 30 ekor mencit jantan galur long evans dipisahkan menjadi kelompok kontrol negatif, kontrol positif (asam kojic), dan ekstrak kopi BP-42. Tikus tersebut diberi perlakuan skin graft dan menerima pengobatan luka berdasarkan kelompok perlakuan.

Hasil: Ekstrak biji kopi BP-42 memiliki kandungan kafein, hidrokuinon, asam lemak bebas, asam klorogenat, dan trigonelline. Seperti yang diharapkan, ekstrak menunjukkan aktivitas anti-tirosinase pada tikus. Tikus dengan ekstrak kopi BP-42 menunjukkan hasil yang sama dengan kelompok kontrol positif.

Kesimpulan: Ekstrak biji kopi BP-42 menunjukkan aktivitas anti-tirosinase yang penting, menjanjikan untuk digunakan sebagai kandidat anti-pigmentasi alami

Daftar Isi

Halaman Sampul Dalam	i
Halaman Prasyarat Gelar	ii
Halaman Pengesahan	iii
Halaman Penetapan Panitia Penguji	iv
Ucapan Terima Kasih	v
<i>Summary</i>	vii
Ringkasan	viii
Daftar Isi	ix
Daftar Tabel	xi
Daftar Gambar	xii
Daftar Lampiran	xiii
ARTI SINGKATAN & ISTILAH	xiv
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Tujuan Penelitian	3
1.3.1 Tujuan Umum	3
1.3.2 Tujuan Khusus	3
1.4 Manfaat Penelitian	4
1.4.1 Manfaat Bagi Ilmu Pengetahuan	4
1.4.2 Manfaat Bagi Institusi Pendidikan	4
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	5
2.1 Melanogenesis	5
2.2 Keratinosit	6
2.3 Enzim Tirosinase	7
2.4 <i>Pathway</i> Melanogenesis	8
2.5 Skin Graft	11
2.6 Prosedur Pengambilan Skin Graft	15
2.7 Patofisiologi Skin Graft	16
2.8 Komplikasi Hiperpigmentasi Skin Graft	17
2.9 Kopi Robusta (<i>Coffea canephora</i> var.robusta)	19
2.9.1 Morfologi Kopi Robusta BP 42	19
2.9.2 Kandungan Senyawa Kimia pada Kopi Robusta	22
BAB III KERANGKA KONSEPTUAL	23
3.1 Kerangka Konsep	23
3.2 Hipotesis	25
BAB IV METODE PENELITIAN	26
4.1 Jenis dan Rancangan Penelitian	26
4.2 Unit Eksperimental	26
4.3 Besar Unit Eksperimen	27
4.4 Variabel Penelitian dan Definisi Operasional	29
4.5 Bahan	31

4.6 Alat	32
4.7 Lokasi dan waktu Penelitian	34
4.8 Prosedur Penelitian	34
4.8.1 Uji Kelayakan Etik	34
4.8.2 Proses Adaptasi Tikus	34
4.8.3 Ekstraksi	35
4.8.4 Uji Karakterisasi Ekstrak Kopi	35
4.8.5 Pembuatan Gel Ekstrak kopi Robusta BP 42 dan Gel Asam Kojic 1 %	39
4.8.6 Tahap Perlakuan	40
4.8.7 Pembuatan Sediaan Histologis	42
4.9 Analisis Data	42
4.9 Kerangka Operasional Penelitian	43
BAB V HASIL DAN PEMBAHASAN	45
5.1 Hasil Penelitian Tahap 1	45
5.1.2 Uji Hambatan Tirosinase	46
5.1.3 Pembahasan	51
5.2 Hasil Penelitian Tahap 2	54
5.2.1 Pembahasan	59
BAB VI PENUTUP	62
6.1 Kesimpulan	62
DAFTAR PUSTAKA	63

Daftar Tabel

Tabel 2. 1 Klasifikasi skin graft berdasarkan ketebalan kulit	12
Tabel 5. 1 Hasil analisa ekstrak kopi Robusta BP 42	45
Tabel 5 2 Rata-rata % hambatan tyrosinase asam kojic terhadap L-tirosinase dan Uji Anova.....	47
Tabel 5 3 Uji post hoc antar kelompok konsentrasi.....	48
Tabel 5 4 Rata-rata % hambatan tyrosinase ekstrak kopi BP-42 terhadap L-tirosinase dan Uji Anova.....	49
Tabel 5 5 Hambatan tirosinase asam kojic vs ekstrak kopi robusta BP-42	50

Daftar Gambar

Gambar 2. 1 Hubungan keratinosit dan melanosit.....	5
Gambar 2. 2 Struktur cristallographic enzim tirosinase dari <i>Agaricus bisporus</i>	8
Gambar 2. 3 Proses sintesis 2 tipe melanin dan enzim yang terlibat dalam sintesis melanin (Gillbro and Olsson 2011).....	9
Gambar 2. 4 Sintesis eumelanin dan pheomelanin dalam melanosom melanosit	11
Gambar 2. 5 Aplikasi STSG untuk penutupan defek.....	13
Gambar 2. 6 Aplikasi FTSG untuk penutupan defek.....	14
Gambar 2. 7 Klon BP 42.....	22
Gambar 5. 1 Hasil analisis profiling ekstrak kopi robusta dengan menggunakan metode GC-MS.....	45
Gambar 5. 2 Kurva hambatan asam kojic	48
Gambar 5. 3 Kurva hambatan ekstrak kopi robusta BP-42	49
Gambar 5. 4 Perbedaan kekuatan % hambatan antara asam kojic dibandingkan dengan ekstrak kopi Robusta BP 42.....	51
Gambar 5. 5 Kontrol Negatif Hari Ke 0 sampai Hari Ke 21	55
Gambar 5. 6 Kelompok Perlakuan Hari Ke 0 sampai Hari Ke 21	56
Gambar 5. 7 Kelompok kontrol positif	57
Gambar 5. 8 Perbandingan daya hambat tyrosinase berdasarkan intensitas warna.....	57
Gambar 5. 9 grafik perbandingan daya hambat tirosinase berdasarkan analisa image J	58

Daftar Lampiran

ARTI SINGKATAN & ISTILAH

ACTH	= <i>Adrenocorticotropic Hormone</i>
ASP	= <i>Agonist Stimulating Protein</i>
CCL2	= <i>Chemokine Ligand 2</i>
CMC-Na	= <i>carboxymethylcellulose sodium</i>
dCQA	= <i>Caffeoylquinic Acid</i>
DOPA	= <i>dihydroxyphenylalanine</i>
DPI	= <i>dihydroxyindole</i>
DPICA	= <i>DHI-2-carboxyl acid</i>
DQ	= <i>DOP-Aquinone</i>
FTD	= <i>Full Thickness Debridement</i>
FTSG	= <i>Full Thicknes Skin Graft</i>
HPMC	= <i>hydroxypropylmethylcellulose</i>
IL	= <i>Interleukin</i>
IP3/DAG	= <i>trisphosphate/diacylglycerol</i>
MC-1R	= <i>Melanocortin 1 Receptor</i>
MITF	= <i>Microphthalmia-Associated Transcription Factor</i>
NO	= <i>nitric oxide</i>
NRG-1	= <i>Neuregulin-1</i>
PGE2	= <i>Prostaglandin E</i>
PGF _{2α}	= <i>Prostaglandin F</i>
PKC	= <i>Protein Kinase C</i>
POMC	= <i>Pro-Opiomelanocortin</i>
SCF	= <i>Stem Cell Factor</i>
STSG	= <i>Split Thickness Skin Graft</i>
TGF	= <i>Tumor growth factor</i>

<i>TH-1</i>	= <i>Tyrosine Hydroxylase Isoform I</i>
TNF	= <i>Tumor necrosis factor</i>
TRP-1	= Tyrosinase-Related Protein-1
TRP-2	= <i>DOPA- Chrome Tautomerase</i>
UVR	= ultraviolet reaktif
VEGF	= <i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
Wnt	= <i>Wingless-related integration site</i>
α -MSH	= <i>α-Melanocyte Stimulating Hormone</i>
α -MSH	= <i>α-Melanocyte-Stimulating Hormone</i>
LC-MS.	= <i>Liquid Chromatography-Mass Spectrometry</i>
GC-MS.	= <i>Gas Chromatography-Mass Spectrometry</i>

BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Skin graft adalah salah satu pilihan terbaik untuk penutupan luka. Metode ini merupakan *gold standard* untuk perawatan luka bakar pada kulit.¹ *Skin graft* juga menjadi pilihan untuk penutupan luka untuk rekonstruksi areola *mammae* dan terapi vitiligo karena memberikan penampilan yang sangat baik.²⁻⁴ Terdapat dua jenis *Skin graft* yaitu *Split Thickness Skin Graft* (STSG) dan *Full Thickness Skin Graft* (FTSG).⁵ Kedua metode ini tidak hanya memberikan manfaat yang luar biasa bagi pasien dengan proses penyembuhan yang sangat cepat. Namun, *skin graft* juga memberikan beberapa masalah seperti komplikasi dan hiperpigmentasi. Dilaporkan terdapat beberapa pasien sering merasa kurang cantik dan kualitas hidupnya menurun karena kulit hasil *skin graft* mengalami hiperpigmentasi. Hiperpigmentasi menjadi masalah kosmetik yang cukup serius, terutama jika terjadi pada wajah dan leher.⁶

Hiperpigmentasi terjadi karena peningkatan reaksi Dihidroksifenilalanin (DOPA) pada satu sampai tiga minggu setelah dilakukan *skin graft*. Penelitian lain menunjukkan peningkatan yang signifikan pada enzim melatonin seperti Tyrosinase, Tyrosinase-Related Protein (TYRP1), dan DOPA-chrome Tautomerase (TYRP2).⁶ Enzim tersebut akan diekspresikan secara berlebihan selama empat minggu setelah *skin graft*.⁷ Selain peningkatan kadar enzim tersebut juga terjadi hiperpigmentasi karena peningkatan kadar dan ekspresi α -Melanocyte-Stimulating Hormone (α -MSH) dan Adrenocorticotrophic Hormone (ACTH) yang muncul di awal proses penyembuhan *skin graft*. Peningkatan ekspresi α -MSH berkorelasi signifikan dengan peningkatan fungsi transfer melanin pada melanosit dan jumlah melanin pada proses pigmentasi pada kulit.⁸ Penelitian lain juga menyebutkan bahwa proses kontraksi setelah *skin graft*

menyebabkan akumulasi melanin dan memperparah derajat pigmentasi. Bukti lain menunjukkan bahwa melanosom pada kulit yang dicangkokkan lebih besar, lebih berpigmen, dan resisten terhadap lisosom.⁹

Berbagai upaya telah dilakukan untuk mengurangi terjadinya komplikasi hiperpigmentasi, baik pada tahap klinis maupun tahap laboratorium. Banyak peneliti menggunakan *asam kojic* untuk mengurangi efek pigmentasi. *Asam kojic* menghambat tirosinase dan telah dipelajari secara ekstensif dalam industri kosmetik. *Asam kojic* dan turunannya memiliki sifat radioprotektif dan memutihkan. Karena aktivitas penghambatan tirosinase, *asam kojic* melindungi kulit dari sinar ultraviolet (UV), mengurangi hiperpigmentasi, dan mencegah melanogenesis. Senyawa aktif ini diproduksi oleh beberapa jenis jamur dan juga merupakan produk sampingan dari proses fermentasi makanan tertentu, seperti kecap dan sake.¹⁰ Meskipun *jiic* bukan racun dalam studi akut, kronis, reproduksi, dan genotoksisitas, beberapa melaporkan bahwa kulit sejumlah orang menjadi lebih sensitif karena penggunaan asam kojic 2%. Laporan lain menemukan bahwa asam kojic menimbulkan risiko efek samping yang sangat potensial pada kelenjar tiroid potensial.^{10,11} Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai alternatif dari asam kojic yang memiliki risiko efek samping lebih rendah.

Kopi sangat melimpah di Indonesia, khususnya di Kabupaten Jember. Indonesia merupakan negara terbesar ketiga dalam produksi kopi hijau robusta.¹² Salah satu galur kopi robusta terbaik adalah galur BP-42 yang dikembangkan oleh Balai Penelitian Kopi dan Kakao Indonesia, Kabupaten Jember, Jawa Timur. Kopi BP-42 memiliki kualitas biji tertinggi dengan skor organoleptik tertinggi dibandingkan dengan galur lainnya.¹³ Kopi dipercaya dapat mengurangi jumlah hiperpigmentasi pada kulit. Dilaporkan bahwa konsumsi kopi sebagai asupan diet dapat secara signifikan mengurangi bintik-

bintik *photoaging UV* pada 244 wanita Jepang.¹⁴ Penelitian lain melaporkan bahwa ekstrak kopi memiliki efek anti-penuaan dan pencerah kulit dengan menghambat proses elastase. Ekstrak kopi mengandung kafein dan asam klorogenat yang dapat mengurangi stres oksidatif dan peradangan.^{15,16} Namun aktivitas penghambatan anti-tirosinase ekstrak kopi dibandingkan dengan asam kojic belum banyak diketahui.

1.2 Rumusan Masalah

1. Apa kandungan-kandungan zat aktif dari ekstrak kopi robusta strain BP-42?
2. Apakah ekstrak kopi robusta BP-42 memiliki aktifitas antitirosinase?
3. Bagaimana efek antitirosinase kopi BP-42 terhadap proses pigmentasi pasca *skin-graft*?

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

Tujuan umum penelitian ini adalah membuktikan efek antitirosinase gel ekstrak kopi Robusta BP 42 terhadap proses pigmentasi pasca skin graft.

1.3.2 Tujuan Khusus

1. Mengidentifikasi kandungan zat aktif dari ekstrak kopi robusta strain BP-42
2. Mengetahui aktifitas anti-tirosinase dari ekstrak kopi robusta BP-42
3. Mengetahui efek antitirosinase kopi BP-42 terhadap proses pigmentasi pasca *skin-graft*

1.4 Manfaat Penelitian

Manfaat dari penelitian ini adalah:

1.4.1 Manfaat Bagi Ilmu Pengetahuan

- Manfaat secara teori: Memberikan informasi ilmiah kandungan bahan aktif antitirozinase alami kopi Robusta BP 42 sebagai bahan topikal yang berfungsi sebagai preventif terhadap terjadinya hiperpigmentasi pasca skin graft.
- Manfaat secara praktis: Hasil penelitian bisa menjadi rekomendasi untuk uji klinis lebih lanjut sebagai alternatif terapi hiperpigmentasi pasca skin graft maupun penyembuhan luka lainnya baik sebagai terapi kombinasi maupun terapi tunggal.

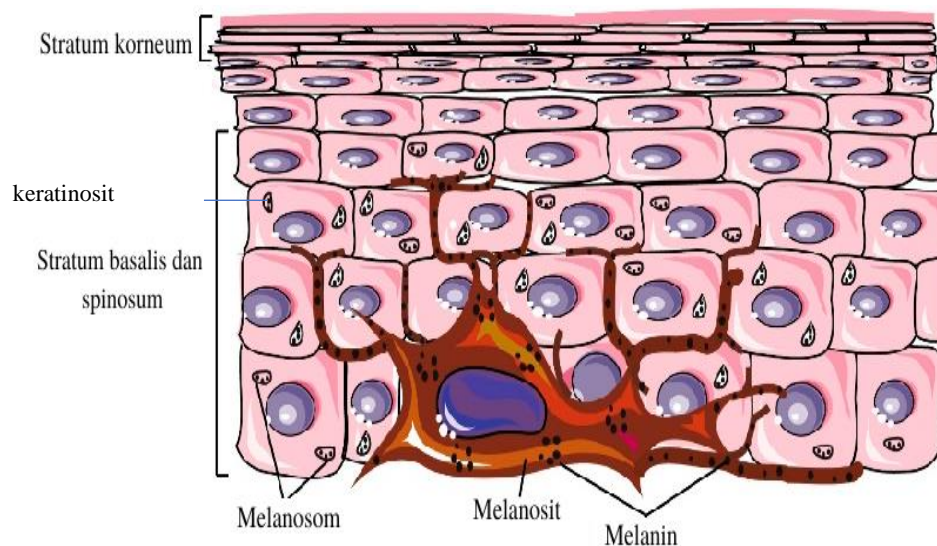
1.4.2 Manfaat Bagi Institusi Pendidikan

- Hasil penelitian menjadi salah satu kontribusi bagi institusi pendidikan dalam pengembangan ilmu pengetahuan yang berbasis pengembangan obat-obatan dari bahan alami

BAB II TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Melanogenesis

Warna kulit, rambut dan mata terlihat nyata disebabkan oleh adanya kandungan pigmen melanin pada jaringan tersebut. Pigmen melanin dihasilkan oleh sel spesifik yang disebut melanosit. Sel ini mempunyai peran penting untuk mendistribusikan pigmen melanin pada jaringan. Selain memberikan warna, sel ini juga berfungsi sebagai fotoprotektif karena memiliki kemampuan untuk mengabsorpsi cahaya. Melanosit pada kulit terdapat pada lapisan stratum basalis lapisan epidermis. Pada lapisan tersebut melanosit membentuk unit melanin dimana satu sel melanosit berikatan dengan 30-40 sel keratinosit seperti tampak pada gambar 2.1.¹⁷



Gambar 2. 1 Hubungan keratinosit dan melanosit
Melanosit dendritik terletak di lapisan basal kulit dan menghasilkan melanin. Pigmen melanin dalam melanosom ditransfer ke keratinosit (D'Mello et al., 2016)

Pada kulit terdapat kurang lebih 1200 melanosit per mm². Unit melanin epidermis merupakan elemen yang sangat aktif. Proses sintesis, penyimpanan dan transportasi melanin ini terjadi di dalam organel sel melanosit yang disebut melanosom. Melanosom

merupakan organel mirip lisosom subseluler dimana pigmen melanin disintesis, disimpan dan mengalami maturasi sebelum didistribusikan ke keratinosit di sekitarnya. Proses maturasi terjadi pada saat PH ekstraseluler meningkat dari PH 5 menjadi PH 6.8. Selanjutnya melanosom yang berisi pigmen mengalami translokasi, dengan cara bergerak sepanjang mikrotubulus dari daerah perinuklear ke bagian ujung dendrit melanosit. Dari bagian ujung ini kemudian melanosom berpindah dan menyebar ke dalam sitoplasma keratinosit dan membatasi inti dari keratinosit.⁷

Pada orang yang memiliki warna kulit lebih gelap melanosom cenderung memiliki ukuran lebih besar, memanjang dan mengandung banyak melanin sehingga memerlukan waktu degradasi yang lebih lama di dalam keratinosit. Sinar UV ini hanya mempengaruhi jumlah dendrit dari melanosit dan proses translokasi melanosom ke keratinosit. Faktor yang paling menentukan ciri dari melanosit adalah faktor genetik yang dibawa sejak lahir oleh setiap individu.⁹

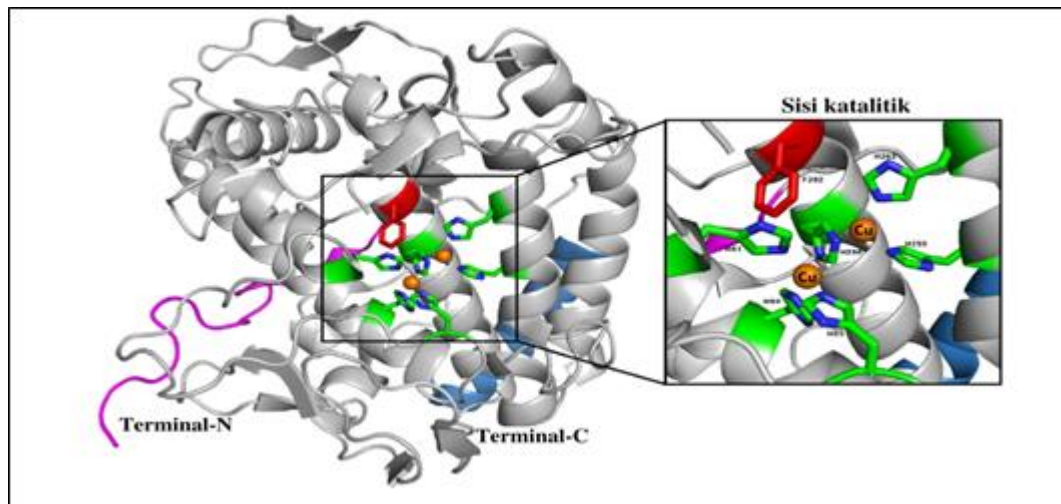
2.2 Keratinosit

Keratinosit merupakan sel yang menyusun sebagian besar lapisan epidermis kulit. Keratinosit ini mengalami proses keratinisasi dan deskuamasi pada bagian superfisialnya. Sel-sel keratinosit yang mengandung keratin dan telah mengalami deskuamasi akan digantikan oleh sel-sel dibawahnya yang merupakan hasil dari peristiwa mitosis. Populasi sel baru akan bergerak ke atas mendorong sel keratinosit lama. Selama proses pergeseran ke permukaan, sel ini memproduksi keratin dan mengendapkannya di sitoplasma sehingga seluruh sel berisi keratin yang siap mengalami proses deskuamasi ketika sampai pada lapisan permukaan dari epidermis. Fungsi utama keratinosit ini adalah mengatur proses diferensiasi, proliferasi,

melanogenesis dan dendritogenesis melalui faktor-faktor parakrin yang dihasilkan yang bersifat menghambat atau menstimulasi pada proses produksi melanin.¹⁸

2.3 Enzim Tirosinase

Enzim yang terlibat dalam proses melanogenesis antara lain: Tyrosinase/tirosinase, Tyrosine Hydroxylase Isoform I (TH-1), Phenylalanine Hydroxylase (PAH), Tyrosinase- Related Protein-1 (TRP-1) dan Tyrosinase Related Protein-2 (TRP-2).⁸ Tyrosinase merupakan enzim utama dan memiliki peran penting sebagai kunci awal proses melanogenesis. Enzim ini hanya dihasilkan oleh sel melanosit dan terdapat pada membran melanosom. Secara struktur enzim ini mengandung dua ion Cu yang dikelilingi tiga pasang residu histidin yang berperan penting dalam proses katalitik. Selain itu enzim tirosinase ini memiliki sisi aktif dengan tiga macam bentuk yaitu sebagai bentuk oxy, Emet dan deoxy dalam proses pembentukan pigmen (Lihat gambar 2.2 dibawah ini). Bagian paling khusus dari sisi yang aktif adalah bagian yang mengandung Cu dimana bagian ini akan berinteraksi dengan dioksigen untuk membentuk senyawa kimia antara yang sangat reaktif dan bereaksi langsung dalam proses hidroksilasi monofenol menjadi difenol (aktivitas monofenolase) dan dalam proses oksidasi o-difenol menjadi o-kuinon (aktivitas difenolase). Bentuk Emet dari enzim tirosinase memiliki afinitas yang lebih tinggi terhadap L-DOPA dibandingkan bentuk aktif lainnya sehingga bentuk ini dianggap sebagai target penting untuk kerja zat-zat antitirosinase.^{19,20}



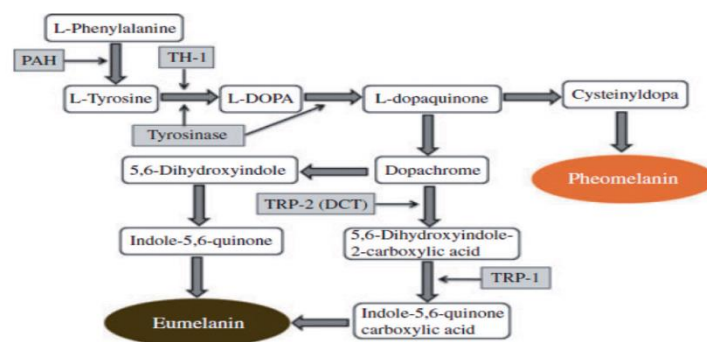
Gambar 2. 2 Struktur cristallographic enzim tirosinase dari *Agaricus bisporus*. Gambaran enzim tyrosinase dalam bentuk deoksi (kode PDB 2Y9X) 35 ditampilkan dan direpresentasikan dalam model kartun dengan domain terminal N dan C yang digambarkan masing-masing dalam warna pink dan biru. Sisi katalitik terdiri dari dua ion tembaga (warna oranye) dikelilingi oleh enam gugus histidin dan gambaran residu placeholder (warna merah). Sumber: Pillaiyar et al., 2018

2.4 *Pathway* Melanogenesis

Melanogenesis merupakan proses pembentukan melanin di dalam melanosit dimana proses ini dipengaruhi oleh 2 faktor yaitu: 1) faktor intrinsik seperti faktor genetik, usia, etnis, molekul yang disekresi oleh keratinosit, fibroblas, komponen inflamasi, sel saraf atau hormon yang dihasilkan saat kehamilan serta kondisi diabetes, dan 2) faktor ekstrinsik yang meliputi sinar ultraviolet reaktif (UVR) dan senyawa-senyawa kimia tertentu yang dapat mempengaruhi melanogenesis. Proses melanogenesis meliputi 2 macam proses biosintesis melanin yaitu sintesis eumelanin dan feomelanin. Sintesis eumelanin berasal dari L-dopachrome yang menghasilkan warna hitam kecoklatan sedangkan sintesis feomelanin menghasilkan warna kuning kemerahan dimana proses sintesisnya tergantung pada ketersediaan senyawa sulfhidril dalam melanosom. Sintesis melanin meliputi serangkaian aksi produk yang dikatalisasi, dikoordinasi dan diatur oleh kompleks enzim secara ketat.²¹

Proses awal melanogenesis dimulai dengan perubahan L-phenylalanine oleh enzim Phenylalanine Hidroksilase (PAH) menjadi L-Tyrosine. Selanjutnya, enzim tirosinase bersama enzim TH-1 memainkan peran penting proses awal katalisis dengan mengkonversi L-tyrosine menjadi L-3,4-dihydroxyphenylalanine (DOPA) melalui proses hidrosilasi. Optimalisasi kerja enzim tirosinase ini sangat dipengaruhi oleh ikatannya dengan tembaga. Enzim tirosinase kemudian mengoksidasi L-DOPA menjadi DOP-Aquinone (DQ). DQ ini merupakan prekursor intermediat melanin yang nantinya akan mengalami proses lebih lanjut dalam jalur sintesis eumelanin atau sintesis feomelanin.²²

Pada proses sintesis feomelanin, DQ akan diubah menjadi sisteinil DOPA oleh sistein, dimana produk ini akan dioksidasi dan dipolimerisasi untuk menghasilkan feomelanin yang berwarna kuning kemerahan dan mudah larut. Sedangkan pada sintesis eumelanin, DQ akan langsung menjadi DOPochrome yang berwarna coklat kehitaman. DOPochrome secara spontan akan kehilangan asam karboksilat dan 5,6 dihydroxyindole (DPI) yang segera teroksidasi dan terpolimerisasi menjadi coklat kehitaman. DOPA chrome tautomerase (TYRP2/DCT) akan mengubah DOPochrome menjadi DHI-2-carboxyl acid (DPICA). Selanjutnya tirosinase dan TYRP1 akan mengkonversi zat ini menjadi melanin yang berwarna coklat terang. Melanin DPI dan melanin DPICA berwarna coklat kehitaman yang disebut sebagai eumelanin.²³



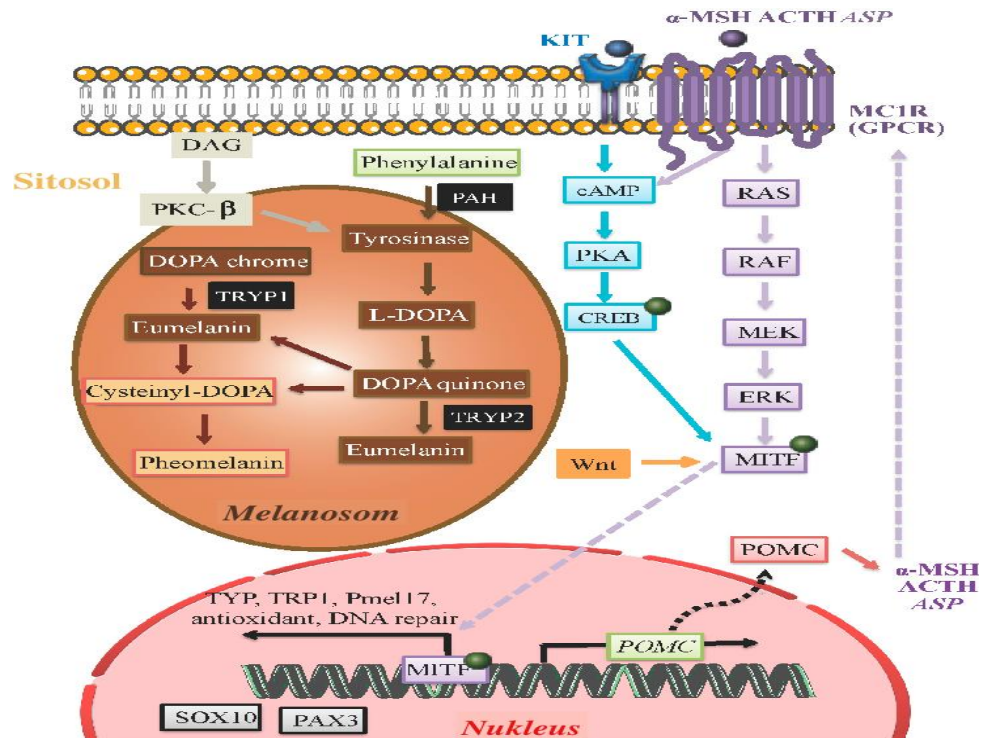
Gambar 2. 3 Proses sintesis 2 tipe melanin dan enzim yang terlibat dalam sintesis melanin (Gillbro and Olsson 2011)

Jalur sinyal molekul inti pada proses melanogenesis merupakan jalur yang berhubungan dengan regulasi aktivitas enzim dimana jalur ini melibatkan banyak molekul pengatur genetik seperti: 1. α -Melanocyte Stimulating Hormone (α -MSH) ; 2. Microphthalmia-Associated Transcription Factor (MITF) ; 3. Wntless-related integration site (Wnt) ; 4. Protein Kinase C; 5. SOX Family dan 6. Reseptor glutamat keratinosit serta PAX3.²⁴

Adapun mekanisme jalur sinyal molekul inti proses melanogenesis sebagai berikut: Jalur pensinyalan pada bagian hulu dimulai dengan adanya aktivasi dari MC1R yang berikatan secara agonis dengan α -MSH atau ACTH. Ikatan agonis ini akan menjadi rangsangan awal proses sintesis eumelanin sementara sintesis pheomelanin disimulasikan melalui Agonist Stimulating Protein (ASP). Aktivasi MC1R oleh α -MSH atau ACTH akan menyebabkan dikeluarkannya sinyal downstream dimana sinyal ini akan mengaktifkan sintesis cAMP dan faktor transkripsi CREB yang menginduksi ekspresi MITF. Selain itu, jalur Wnt juga dapat berkontribusi pada ekspresi MITF. Peningkatan regulasi MITF menginduksi ekspresi TYR yang mengarah ke induksi melanogenesis. Iradiasi UVB meningkatkan SOX9 dan mengaktifkan promotor MITF diikuti oleh induksi TYRP2. Selain itu faktor transkripsi MITF mendorong ekspresi sejumlah gen-gen termasuk SOX10 dan PAX3.²⁵

Selain jalur sinyal molekul inti, terdapat jalur lain yang berhubungan dengan jalur inti yaitu jalur sinyal yang diinisiasi akibat respon inflamasi dan hormonal akibat kehamilan. Pada jalur inflamasi, sitokin pro inflamasi interleukin akan merangsang peningkatan kadar mRNA POMC, peptida POMC, dan reseptor MSH di kulit. Sedangkan pada saat kehamilan proses melanogenesis terjadi sebagai akibat peningkatan ikatan hormon estrogen dengan reseptor muskarinik dan reseptor estrogen α dan β . Ikatan hormon estrogen dengan reseptor akan menyebabkan terjadinya

produksi adenyl cyclase dan cAMP serta aktivasi PKC β melalui jalur inositol trisphosphate/diacylglycerol (IP3/DAG). Selanjutnya PKC β akan menyebabkan terjadinya fosforilasi tirosinase sehingga proses melanogenesis ini bisa berjalan.²⁶



Gambar 2. 4 Sintesis eumelanin dan pheomelanin dalam melanosom melanosit

2.5 Skin Graft

Pemilihan metode untuk penutupan luka sangat tergantung pada daerah luka, besar defek luka, modalitas yang ada disekitar luka dan strategi penutupan luka yang dikuasai oleh ahli bedah. Ada berbagai teknik yang dapat dipakai oleh ahli bedah untuk menyelesaikan masalah penutupan luka. Berdasarkan tangga rekonstruktif pilihan teknik penutupan luka harus dimulai dengan teknik yang sederhana dan efektif. Teknik yang lebih canggih dapat dipakai jika diperlukan dalam situasi tertentu untuk mendapatkan hasil yang lebih baik. Skin graft merupakan salah satu teknik dalam tangga rekonstruktif yang dipilih ketika penutupan primer tidak mungkin dilakukan karena adanya defek yang sangat luas.²⁷

Skin Graft juga merupakan pilihan teknik yang paling sederhana untuk menutupi kehilangan kulit yang dangkal. Teknik ini terdiri dari proses pengambilan sebagian atau keseluruhan ketebalan kulit dengan ukuran yang bervariasi dimana pada proses ini graft yang diambil seluruh lapisannya akan terlepas dari kulit asalnya (donor), selanjutnya proses pemindahan dan penanaman kulit untuk menutupi defek yang akan diperbaiki pada area penerima (resipien). Skin graft ditempatkan di atas dasar luka yang telah disiapkan kemudian diamankan dengan balutan kuat sebagai tie over dressing. Balutan skin graft selanjutnya dipertahankan selama lima sampai tujuh hari untuk memastikan kontak dengan resipien.²⁸

Padgett pada tahun 1946 membuat sistem kategori skin graft berdasarkan ketebalan kulit yaitu *Split Thickness Skin Graft* (STSG) dan *Full Thickness Skin Graft* (FTSG) sebagaimana tabel 2.2 berikut ini²⁹

Tabel 2. 1 Klasifikasi skin graft berdasarkan ketebalan kulit

	Name	Thickness (mm)
Split thickness	Thin (Thiersch-Ollier)	0.15-0.3
	Intermediate (Blair-Brown)	0.3-0.45
	Thick (Padgett)	0.45-0.6
Full thickness	(Wolfe-Krause)	>0.6

Split thickness tipe *thin* (*Thiersch-Ollier*) lebih mudah melekat dan hidup pada resipien, akan tetapi pada proses penyembuhan tipe ini jauh lebih buruk dibandingkan dengan tipe lainnya karena sifat kulit yang tipis, rapuh, dan sering *dischromic*. Selain itu, Tipe ini mudah mengalami retraksi yang disebabkan oleh adanya kontraksi bagian dermis kulit yang tidak lengkap strukturnya. Pada skin graft tipe *intermediate* atau *thick* (jenis *Blair-Brown* atau *Padgett*), kualitas kulit pasca penyembuhan sangat baik, kulit tampak kuat, elastis dan kurang rentan terhadap retraksi.³⁰ Hasil akhir yang

kurang baik dari STSG menyebabkan graft tipe ini hanya digunakan untuk menutup luka bakar yang dalam, kehilangan kulit yang luas di daerah selain wajah dan bagian tubuh yang memiliki vaskularisasi yang minimal, misalnya ulkus pada kaki.³¹ Contoh aplikasi penggunaan skin graft tipe *split thickness* ini dapat dilihat pada gambar 2.6 berikut ini.

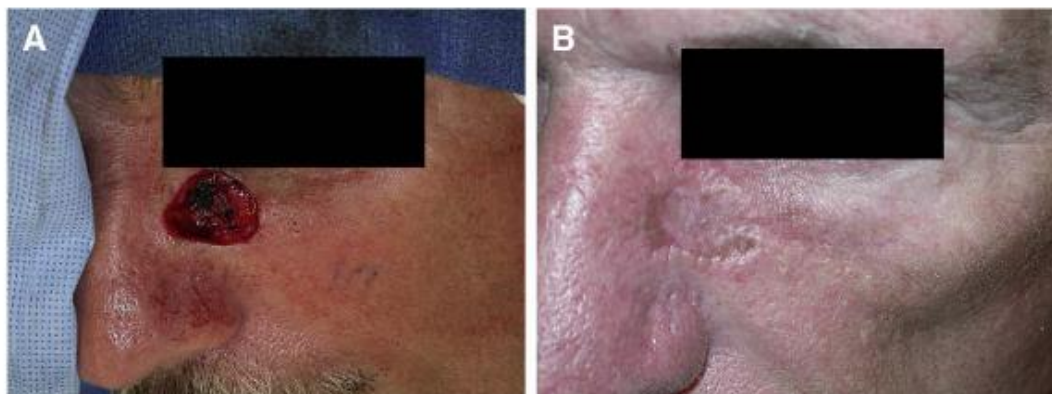


Gambar 2. 5 Aplikasi STSG untuk penutupan defek.

Gambar ini contoh aplikasi STSG untuk penutupan defek pasca eksisi tumor fibrohistiocytoma bahu kiri A. Kondisi defek pra operasi dari. B. Kondisi 1 minggu pasca operasi, setelah eksisi dan skin graft dengan lokasi donor diambil dari paha kiri. C, tampilan 1 bulan Pasca Operasi. D. Kondisi 1 tahun pasca operasi (Andreassi et al., 2005)

Graft jenis STSG merupakan tipe graft yang mengandung epitel dan sebagian dermis. Ketebalan dermis yang dimiliki tipe ini sangat bervariasi tergantung pada kebutuhan. Lokasi donor meliputi daerah paha, bokong, dan punggung. Daerah donor umumnya dapat sembuh secara spontan melalui proses epitelisasi. Sedangkan skin graft tipe FTSG merupakan graft yang mengandung epitel dan keseluruhan ketebalan dermis.

Karakteristik graft ini adalah memiliki bahan padat yang cukup elastis, menghasilkan jaringan parut yang memuaskan dan tidak mengalami retraksi serta memberikan hasil fungsional yang lebih baik. Tipe ini sangat berguna untuk memperbaiki kehilangan kulit pada wajah dan jari, defek yang relatif kecil dan sebagai teknik alternatif dari flap lokal. Lokasi donor untuk FTSG antarlain: kulit *preauricular* dan *postauricular*, *supraclavicular*, *inguinal*, dan sisi medial lengan atas.³¹ Defek donor FTSG biasanya dapat ditutup secara primer. Tipe graft yang paling sering digunakan untuk tujuan dermokosmetik adalah STSG tipe thick atau intermediate untuk perbaikan area yang lebih besar dari 3 sentimeter dan FTSG untuk perbaikan defek yang kurang dari 3 sentimeter.³¹ Gambar 2.7 berikut ini adalah contoh aplikasi penggunaan FTSG pada pasien.



Gambar 2. 6 Aplikasi FTSG untuk penutupan defek

Gambar ini adalah contoh aplikasi FTSG pasca eksisi tumor di wajah. A. Tampilan pra operasi cacat infraorbital kiri setelah eksisi karsinoma sel basal. B. 6 bulan pasca operasi setelah aplikasi FTSG dengan donor berasal dari daerah supraklavikula kiri.

Klasifikasi lain pembagian skin graft adalah berdasarkan asal donor. Graft jenis ini terdiri dari: 1) *autografts*, ketika donor dan penerima adalah individu yang sama; 2) *homografts*, ketika donor dan penerima adalah subjek yang berbeda tetapi memiliki spesies yang sama; dan 3) *hetero atau xenografts*, apabila donor dan penerima memiliki spesies yang berbeda. Homografts selanjutnya dibagi menjadi *isografts*, jika

donor berasal dari subjek dengan kode genetik yang sama misalnya kembar monozigot dan *allografts* jika donor dari subjek dengan antigenisitas yang berbeda.³²

2.6 Prosedur Pengambilan Skin Graft

Ada beberapa faktor yang harus diperhatikan pada saat melakukan proses skin graft agar mendapat graft yang sesuai kebutuhan, dapat mengurangi komplikasi dan mencegah tindakan pembedahan yang masif. Faktor tersebut antarlain 1) lokasi donor; 2) jenis alat yang dipakai; 3) teknik debridemant yang benar pada daerah resipien; 4) teknik homestasis yang tepat; 5) fixasi tie over dressing yang adekuat³². Pemilihan lokasi donor harus memperhatikan kebutuhan respieen baik dari segi luas dan kesesuaian warna jaringan sekitarnya. Hal ini bertujuan untuk mengurangi komplikasi pasca penyembuhan donor khususnya terkait penampilan. Sebaiknya donor diambil dari daerah yang tersembunyi dengan rancangan graft sesuai dengan garis tubuh atau garis batas pakaian seperti pakaian renang di daerah inguinal.³³

Pemilihan alat yang dipakai untuk mengambil donor sangat ditentukan oleh keahlian operator dan jenis graft yang akan diambil. Contohnya pada proses pengambilan FTSG umumnya cukup menggunakan pisau bedah. Pada kondisi tertentu untuk mempercepat pembuangan lemak yang ikut terangkat bersama dermis kulit dapat menggunakan *drum dermatome* atau menghilangkannya dengan gunting⁴. Pengambilan kulit donor STSG dapat dilakukan baik secara manual dengan pisau *HUMBY* atau dengan mesin *electric dermatome*. Ukuran ketebalan kulit yang akan diambil dapat disesuaikan ukurannya pada kedua alat tersebut.²⁹

Teknik dedridemant yang benar dapat mencegah kehilangan darah yang tidak semestinya. Debridemant ini diperlukan untuk mempersiapkan dasar luka menjadi dasar yang vital. Tahapan debridemant yang baik dan benar terdiri dari 1) melakukan anestesi infiltrasi subkutan pada luka dan daerah donor atau menggunakan aplikasi

topikal yang mengandung larutan epinefrin. Pada kondisi tertentu kedua cara ini dapat digunakan; 2) memasang torniket untuk operasi daerah tungkai; 3) melakukan eksisi jaringan sampai ke bagian fascia dengan menggunakan *electrocautery*; 4) mengoleskan agen hemostatik topikal seperti trombin dan fibrinogen untuk mencegah hematoma; 5) mencegah hipotermia, menggunakan dressing kompresi dan melakukan elevasi anggota tubuh; 6) melakukan eksisi secara bertahap untuk luka yang luas contohnya eksisi bertahap luka bakar derajat berat.³⁴

Pasca pengambilan kulit, daerah donor ditutup dengan pembalut luka yang mengandung bahan-bahan yang dapat melembabkan lingkungan luka. Sementara graft pada daerah resipien ditutup dengan dressing yang mengandung antiseptik dan dilapisi dengan balutan tambahan di atasnya yang disebut perban dasi atau tie over dressing. Balutan tambahan ini bersifat lembut memiliki tekanan sekitar 10-20 mmHg yang berfungsi untuk meningkatkan perlekatan graft tanpa menyebabkan nekrosis. Selanjutnya, tie over dressing difiksasi dengan kuat pada tiap sudutnya untuk mencegah pergeseran graft, meminimalkan risiko pembentukan hematoma atau seroma dan meningkatkan viabilitas graft.³⁵

2.7 Patofisiologi Skin Graft

Proses perlekatan skin graft identik dengan proses penyembuhan luka. Ada tiga fase yang terjadi pada proses ini yaitu 1) fase imbibisi, merupakan fase peradangan yang terjadi pada 24-48 jam pasca penempelan graft; 2) fase revaskularisasi yang terjadi pada hari ke-5 sampai hari ke-7. Fase ini mirip dengan fase fibroplasia dari proses penyembuhan luka; 3) fase penyesuaian (*adjustment*), retraksi dan distensi. Proses perlekatan antara donor dan resipien disebabkan oleh adanya fibrin dan nutrisi yang berasal dari eksudat. Proses perlekatan akan diikuti dengan respon tombol endotel

dasar luka untuk membentuk kapiler baru yang bergerak dari bagian bawah dan bagian tepi dasar luka menuju ke seluruh bagian jaringan graft. Kapiler baru yang terbentuk merupakan respon donor untuk mengembalikan proses vaskularisasi secara langsung terhadap jaringan graft. Proses neovaskularisasi ini berlangsung selama 5-7 hari, selanjutnya skin graft dinyatakan telah melekat atau istilahnya 'take'. Setelah itu graft memasuki fase penyesuaian di mana skin graft mengalami proses retraksi yang berlangsung selama 1-2 bulan. Fase adjustment kemudian diakhiri dengan proses distensi dan reinnervasi skin graft.³⁶

2.8 Komplikasi Hiperpigmentasi Skin Graft

Komplikasi pasca skin graft berkaitan dengan ketebalan kulit skin graft. Semakin tipis kulit graft maka komplikasi semakin mudah terjadi. Komplikasi pasca transplantasi graft antaralain: timbulnya kontraksi, menurunnya pertumbuhan rambut, rendahnya daya tahan kulit dan terjadinya hiperpigmentasi. Hiperpigmentasi ini biasanya muncul lebih awal dibandingkan komplikasi yang lainnya. Gangguan pigmentasi ini bersifat ireversibel dan menetap sehingga menjadi masalah yang sulit diterima oleh seseorang, bahkan tidak jarang pasien merasa putus asa dengan kondisi tubuh barunya yang tidak normal akibat skin graft ini.³⁷

Penelitian klinis menunjukkan beberapa faktor mempengaruhi perubahan warna pada skin graft. Faktor tersebut antara lain: 1) waktu, warna graft pada awal penyembuhan sampai dengan satu bulan pasca perlekatan tampak gelap akan tetapi seiring berjalannya waktu warna menjadi relatif lebih terang, tidak terlalu merah, dan lebih kuning. Pada beberapa orang dibutuhkan waktu yang lama untuk dapat mendekati warna yang serupa antara warna donor dan resipien; 2) Warna kulit donor, jika kulit tempat donor lebih terang, graft yang ditransplantasikan menjadi lebih terang dan tidak

terlalu merah; 3) Jenis kelamin, graft lebih terang pada wanita dibandingkan pada pria; 4) Jenis graft, hasil penelitian menunjukkan bahwa jenis graft tidak terkait dengan kecerahan dan kemerahan pada kulit graft akan tetapi lebih berhubungan dengan warna kekuningan kulit graft; 5) Lokasi resipien, warna kulit graft menjadi lebih gelap saat ditransplantasikan ke tangan, kaki, dan tungkai bawah; 7) Tipe warna kulit, graft yang berasal dari orang dengan jenis warna kulit *Fitzpatrick Skin Type III* lebih terang dibandingkan graft yang berasal dari orang dengan jenis warna kulit *Fitzpatrick Skin Type IV* dan *V*. Berdasarkan faktor yang mempengaruhi perubahan warna skin graft diatas, dilaporkan bahwa waktu dan kecerahan kulit tempat donor merupakan faktor yang paling berpengaruh terhadap perubahan warna skin graft pasca transplantasi.³⁸

Mekanisme hiperpigmentasi pasca skin graft ini dikarenakan adanya abnormalitas dari pigmen melanin yang bertanggung jawab atas perubahan warna kulit. Tsukada (1974) telah menunjukkan bahwa meningkatnya pigmentasi setelah perlekatan skin graft disebabkan oleh meningkatnya jumlah melanosit aktif. Hal ini dibuktikan dengan adanya peningkatan reaksi DOPA minggu pertama sampai minggu ketiga pasca transplantasi. Pada periode ini terlihat gambaran melanosom dan premelanosom dalam berbagai tahap perkembangan termasuk gambaran lisosom yang pecah selama proses transplantasi pada graft. Gambaran ini juga membuktikan bahwa pecahnya lisosom berkontribusi terhadap proses pigmentasi skin graft. Selain itu, adanya proses kontraksi dari kulit skin graft menyebabkan terjadinya tumpukan melanin dan memperberat derajat pigmentasi. Penelitian lain juga melaporkan bahwa melanosom pada keratinosit dari skin graft yang mengalami hiperpigmentasi selain mengalami peningkatan jumlah, struktur ini juga mengalami perubahan ukuran menjadi melanosom tunggal yang lebih besar, lebih berpigmen dan tahan lisosom.³⁹

Penelitian imunohistokimia hiperpigmentasi dengan metode xenograft dimana kulit graft manusia ditransplantasikan pada tikus polos athymic (BALB / C-nu/nu) membuktikan bahwa melanosit positif-DOPA dapat dilihat setelah 120 jam pasca transplantasi sedangkan deposisi melanin terlihat di sepanjang lapisan sel basal pada dua minggu pasca transplantasi. Jumlah melanin semakin meningkat seiring berjalannya waktu. Pada pewarnaan imunohistokimia menunjukkan bahwa jumlah tiga enzim spesifik melanosit, yaitu *Tyrosinase*, *Tyrosinase-Related Protein-1* (TRP-1) dan *DOPA-Chrome Tautomerase* (TRP-2) meningkat secara signifikan pada minggu pertama pasca transplantasi. Peningkatan enzim ini bertahan hingga minggu keempat pasca transplantasi. Hasil penelitian ini juga menjelaskan bahwa hormon α -MSH dan hormon ACTH terdeteksi secara jelas di epidermis segera setelah transplantasi. Kadar kedua hormon masih terdeteksi kuat di epidermis dan di dermis 2-4 minggu pasca transplantasi.^{40,41}

Hasil penelitian ini diperkuat oleh penelitian lainnya yang melaporkan bahwa tingkat ekspresi α -MSH dan POMC (*Proopiomelanocortin*) serta level protein mRNA POMC dan α -MSH pada kulit autograft jauh lebih tinggi daripada kontrol kulit normal. Peningkatan ekspresi α -MSH ini berkorelasi secara signifikan dengan peningkatan fungsi genogenesis, transfer melanin dalam melanosit dan jumlah melanin pada epidermis autograft kulit. Penelitian ini menyimpulkan bahwa peningkatan ekspresi dari α -MSH diduga memainkan peran penting dalam proses hiperpigmentasi autograft kulit. Penemuan ini memberikan mekanisme baru dari proses hiperpigmentasi pasca skin graft.²⁶

2.9 Kopi Robusta (*Coffea canephora* var.robusta)

2.9.1 Morfologi Kopi Robusta BP 42

Kopi Robusta berasal dari hutan-hutan rendah Afrika mulai dari Guinea sampai

Uganda dan didatangkan ke Jawa untuk menggantikan kopi Arabika yang rusak karena penyakit. Kegiatan pemuliaan tanaman kopi Robusta dimulai sekitar tahun 1930. Kopi Robusta Indonesia termasuk jenis kopi yang unggul dibandingkan dengan negara lain seperti Vietnam dan Brazil karena termasuk golongan kelompok *Congolese* yang memiliki citra rasa yang lebih baik dari kelompok *Guinean*. Kopi Robusta ini dicirikan dengan habitus pertumbuhan yang tegak kokoh lebar dengan daun dan biji yang berukuran lebih besar dari kopi Arabika. Kopi Robusta hidup pada ketinggian 100–600 m di atas permukaan laut (dpl) dan pada suhu udara yang berkisar antara 22–26 °C. Kopi Robusta lebih mudah beradaptasi dengan suhu yang lebih rendah dibandingkan kopi Arabika.¹²

Kondisi tanah yang diperlukan untuk kopi jenis Robusta hampir sama dengan beberapa jenis kopi lainnya seperti Arabika dan Liberika. Sifat fisik tanah yang baik bagi kopi adalah tanah dengan tekstur *clay-loam*, struktur remah, derajat struktur kuat, porositas dan permeabilitas baik dan tidak berbatu. Sedangkan sifat kimia tanah yang baik bagi kopi adalah tanah dengan kadar nitrogen total > 0.20 %, fosfor > 30 ppm, kalsium tertukar > 0.10 me%, bahan organik > 3.5 % (C-organik > 2 %), pH antara 5.5–6.5. Tanaman kopi juga memerlukan radiasi matahari di atas 0,15 kal/m²/menit untuk mencapai fotosintesis yang maksimal sehingga memberikan pengaruh positif terhadap produksi dan keberlanjutan budidaya kopi Robusta. Selain cahaya matahari kopi ini juga memerlukan curah hujan tahunan yang optimal sebesar 1.200–1.800 mm per tahun.⁴²

Varietas kopi Robusta diturunkan dari beberapa spesies terutama *Canephora*. Kopi Robusta ini dibagi menjadi 2 kelompok utama yaitu 1) *C. canephora* var. Robusta dan 2) *C. canephora* var. Kouilou yang secara morfologi tidak mudah dibedakan³⁸. Setelah dilakukan pemuliaan kopi Robusta selama bertahun-tahun di Indonesia, akhirnya

diperoleh bahan tanaman unggul pertama yaitu Klon BP 42 (*Besoekisch Proefstation* 42). Klon BP 42 merupakan klon pertama yang dihasilkan sebagai sumber bibit. Tanaman ini memiliki dekripsi tipe pertumbuhan yang sedang dengan diameter tajuk sebesar $\pm 2,2$ m, percabangan agak mendatar, dan memiliki ruas cabang pendek. Daun untuk jenis klon ini berbentuk membulat besar, permukaan daun bergelombang tidak jelas, tepi daun memiliki gelombang tegas, daun tua berwarna hijau tua dan daun muda memiliki warna hijau-coklat pucat. Tanaman kopi Robusta Klon BP 42 ini saat berbunga memiliki bunga mekar agak lambat (baik di ketinggian < 400 m dpl dan ketinggian > 400 m dpl). Umur pertama berbunga pada usia 30-36 bulan setelah ditanam di lapangan.¹³

Karakter buah kopi ini antara lain: memiliki dompolan buah antar ruas cukup rapat, masing-masing buah berukuran besar, diskus kecil dan buah masak berwarna merah cerah. Ukuran biji pada kopi ini sekitar ± 25 cc/100 biji dan tergolong biji berukuran besar dan nisbah biji buah mencapai 22,9%. Kopi BP 42 ini memiliki potensi produksi sebesar 1,2 ton/ha kopi pasar untuk populasi 1.600 pohon/ha. Kelemahan kopi klon ini adalah rentan terhadap nematoda parasit dan agak rentan terhadap serangan bubuk buah seperti *H.hampel*. Klon unggul Robusta yang direkomendasikan di Indonesia selain BP 42 antarlain: 1) Klon BP 308 dan 2) Klon SA 436 (*Sumber Asin* 436) serta 3) Klon BP 234.¹³ Lihat gambar 2.8 di bawah ini.



Gambar 2. 7 Klon BP 42

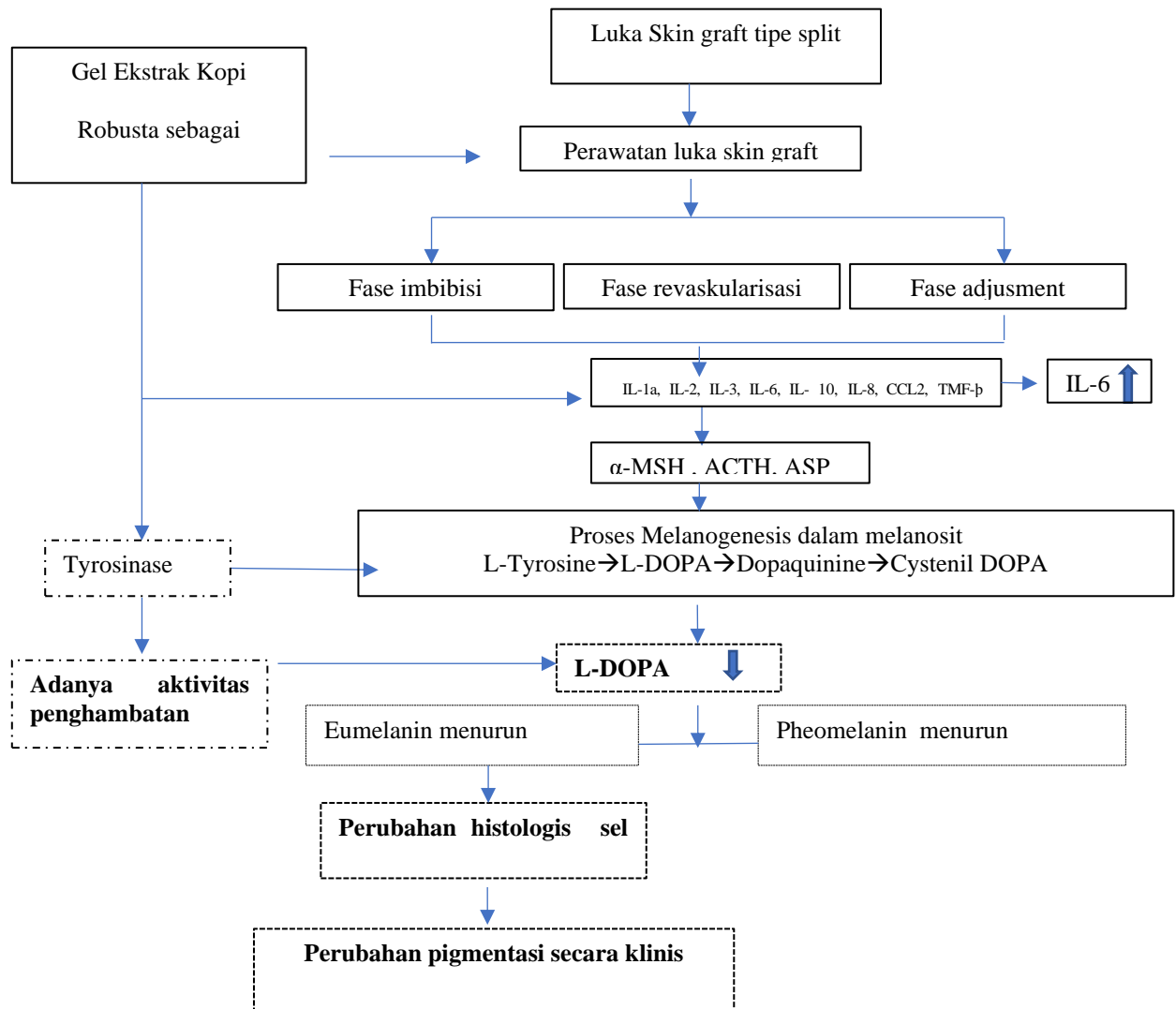
2.9.2 Kandungan Senyawa Kimia pada Kopi Robusta

Kopi mengandung senyawa kimia tertentu yang dilaporkan jumlahnya mencapai 700 jenis senyawa kimia. Adanya senyawa kimia di dalam kopi ini akan memberikan aroma dan cita rasa tersendiri ketika disajikan. Secara garis besar senyawa kimia kopi dibagi menjadi dua golongan yaitu senyawa volatil dan non volatil. Senyawa volatil kopi dilaporkan merupakan sensasi rasa dasar pada kopi dan merupakan faktor utama yang bertanggung jawab atas aroma kopi. Profil senyawa volatil ini dipengaruhi oleh faktor lingkungan seperti: lokasi geografis, jenis tanah, waktu panen buah kopi, spesies kopi, jenis koleksi, kondisi iklim dan pemupukan. Senyawa kimia yang termasuk dalam kelompok volatil antaralain: alkohol, hidrokarbon alifatik, senyawa sulfur, pirazin, piridin, oksazol, pyroles, furan, aldehida, keton dan fenol serta dimetil disulfida.⁴³

Komponen non volatil kopi terdiri dari karbohidrat, protein / fragmen protein, asam dengan berat molekul rendah, asam klorogenat, mineral, kafein, trigonelin, lipid dan melanoidin (molekul yang tidak diketahui jenisnya dan jumlahnya mencapai sekitar 30% dalam kopi).⁴⁴

BAB III KERANGKA KONSEPTUAL

3.1 Kerangka Konsep



Penutupan luka menggunakan *split thickness skin graft* (STSG) akan menimbulkan komplikasi hiperpigmentasi. Hiperpigmentasi terjadi sebagai akibat peningkatan produksi melanin yang kemudian didistribusikan ke lapisan keratinosit dengan membentuk unit melanin. Proses peningkatan produksi melanin yang terjadi di dalam melanoson ini dimulai sejak *graft* melekat dengan bagian resipien dan mulai terbentuk pembuluh darah baru. Proses biosintesis melanin memerlukan enzim tirosinase yang merupakan enzim utama yang berperan untuk mengkonversi tirosin menjadi L-3,4-

dihydroxyphenylalanine (DOPA). DOPA selanjutnya akan mengalami reaksi oksidasi dan polarisasi untuk menghasilkan eumelanin dan pheomelanin yang merupakan melanin pemberi warna pada kulit. Proses biosintesis melanin juga melibatkan peran dari *melanocyte Stimulating Hormone* (α -MSP) dan mediator inflamasi seperti IL-1a, IL-2, IL-3, IL-6, IL-10, kemokin (IL-8, CCL2) dan TNF, serta serotonin yang dilepaskan pada saat awal proses biosintesis. Mediator inflamasi ini ada yang berperan meningkatkan dan ada pula yang menghambat proses melanogenesis.

Kopi Robusta BP 42 adalah salah satu bahan alami yang mengandung penghambat enzim tirosinase alami yang terdiri dari komponen-komponen senyawa asam klorogenat, senyawa fenol seperti flavonoid dan kafein. Senyawa-senyawa tersebut memiliki efek penghambatan terhadap tirosinase melalui mekanisme sinergisitas dengan membentuk kompleks ligand. Pemberian penghambatan enzim tirosinase ini diharapkan dapat menghambat konversi tirosin menjadi *L-3,4-dihydroxyphenylalanine* (DOPA) dari melanosom abnormal, tunggal dan besar serta padat di dalam keratinosit dan melanosit skin graft sehingga proses pembentukan melanin baik eumelanin maupun pheolananin akan berkurang bahkan terhenti. Penurunan produksi melanin akan menurunkan distribusi melanin pada lapisan keratinosit sehingga timbul efek perubahan warna pada permukaan kulit graft pada akhir fase distensi.

Oleh karena itu, untuk mengukur efek sinergisitas penghambat enzim tirosinase yang terdapat didalam kopi Robusta BP 42 maka perlu dilakukan pemeriksaan histologis sel melanosit dengan menggunakan pewarnaan Masson-Fontana untuk mengetahui jumlah melanin pada lapisan kulit dan s pemeriksaan aktifitas enzim tirosinase. Selain

itu penilaian klinis perubahan derajat warna kulit yang dinilai secara visual menggunakan penilaian software *Image J*.

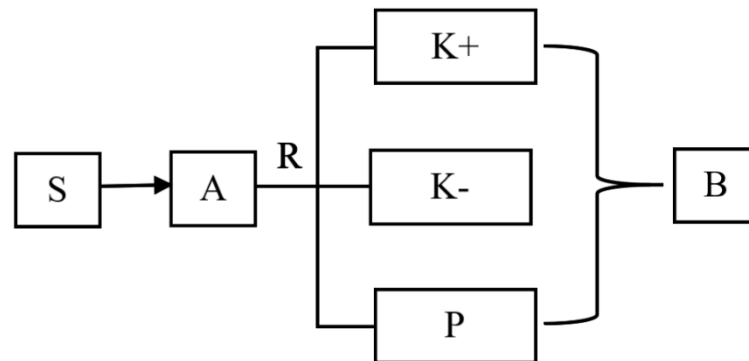
3.2 Hipotesis

1. Ekstrak kopi Robusta BP 42 mengandung bsenyawa bioaktif
2. Ekstrak kopi Robusta BP 42 memiliki aktifitas antitirosinase
3. Terdapat efek antitirosinase kopi BP-42 terhadap proses pigmentasi pasca skin-graft

BAB IV METODE PENELITIAN

4.1 Jenis dan Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian *true experimental laboratories* dengan rancangan *post test only control group design*. Gambaran rancangan penelitian ini dapat dilihat pada gambar berikut ini:



Gambar 4. 1 Rancangan penelitian

Keterangan:

S : 33 ekor tikus yang dipilih berdasarkan rumus

A : Adaptasi tikus selama 7 hari

R : Randomisasi dengan *simple random sampling*

K+ : Kelompok kontrol positif yaitu luka skin graft yang diberi gel asam kojic standard

K- : Kelompok kontrol negatif yaitu luka skin graft yang diberi gel tanpa bahan aktif

P : Kelompok perlakuan yaitu luka yang diberi gel ekstrak kopi robusta BP 42 5%

B : Biopsi jaringan kulit pada hari ke 7, 14, 21 sebelum biopsi dilakukan perawatan luka tiap 3-4 hari sekali

4.2 Unit Eksperimental

Unit eksperimental pada penelitian ini adalah tikus Longs Evans jantan,. Pemilihan tikus ini mengacu kepada penelitian sejenis terkait proses pigmentasi pada kulit. Tikus ini merupakan strain outbred milik spesies *Rattus norvegicus*. Long Evans tikus putih dengan tudung hitam, atau kadang-kadang putih dengan kerudung cokelat dimana

rambut coklat atau hitam meluas sampai pada bagian punggung tikus. Tikus jenis ini digunakan untuk berbagai model penelitian termasuk penelitian terkait dengan proses melanogenesis dan skin graft.

4.3 Besar Unit Eksperimen

Unit eksperimen yang digunakan dalam penelitian ini diambil secara acak melalui teknik random sampling. Adapun kriteria unit eksperimen pada penelitian ini adalah:

a. Kriteria inklusi

1. Tikus Long -Evans jantan
2. Usia 2-3 bulan
3. Berat badan 200-400 gram
4. Tikus dalam keadaan sehat yang ditentukan oleh dengan ciri-ciri: mata jernih, gerakan aktif, feses baik tidak lembek

b. Kriteria eksklusi

Tikus yang tidak mau makan, sakit atau mati pada masa adaptasi.

c. Kriteria drop out

Tikus yang tidak mau makan, sakit atau mati pada masa adaptasi.

d. Replikasi

Besar replikasi pada penelitian ini ditentukan dengan menggunakan rumus tertentu berdasarkan jumlah perlakuan dan replikasi. Pada penelitian ini terdapat 3 perlakuan yang terdiri dari 1) kelompok tikus yang mendapatkan pemberian gel yang mengandung ekstrak kopi Robusta BP 42, 2) kelompok tikus yang mendapatkan sediaan gel berisi asam kojic sebagai kontrol positif dan 3) kelompok tikus yang mendapatkan perawatan dengan gel kosong sebagai kontrol negatif. Penentuan jumlah pengulangan ini berdasarkan rumus perhitungan pengulangan berikut ini :

$$n = \frac{SD^2(Z\alpha + Z\beta)^2}{(x_1 - x_2)^2}$$

Keterangan :

n = Besar sampel atau jumlah replikasi minimum

SD^2 = Standard deviasi sampel

$Z\alpha$ = Nilai distribusi normal baku (tabel Z) pada α tertentu ($\alpha = 0,05$ adalah 1,96) $Z\beta$ =

Nilai distribusi normal baku (tabel Z) pada β tertentu ($\beta = 0,20$ adalah 0,84)

$x_1 - x_2$ = mean outcome kelompok terpapar dan tidak terpapar

Berdasarkan penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Fatimatuzzahro et al., (2020) yang menggunakan perlakuan serupa untuk proses penyembuhan luka pada periodontitis tikus maka jumlah sampel yang diperlukan pada penelitian dengan rumus diatas sebagai berikut:⁴⁵

$$\begin{aligned}n &= \frac{1(1,96+0,84)^2}{(0,92)^2} \\ &= \frac{7,84}{0,846} \\ &= 9,26 \rightarrow 10\end{aligned}$$

Berdasarkan rumus diatas diperoleh $r = 10$ untuk masing – masing kelompok. Penambahan 1 ekor tikus sebagai faktor koreksi pada tiap kelompok sehingga total jumlah tikus pada penelitian ini sebanyak 33 ekor. Pengelompokan unit eksperimen ke dalam 3 grup dilakukan secara acak menggunakan dengan bantuan lotre (*Simple Random*)

4.4 Variabel Penelitian dan Definisi Operasional

Variabel bebas	Definisi Operasional	Alat ukur	Hasil pengukuran	Skala
Gel ekstrak kopi Robusta BP 42 5%	Sediaan semisolid yang homogen mengandung ekstrak kopi robusta dalam basis gel yang terdiri dari TEA, propilen glikol, karbopol dan aquades. Gel ini memiliki konsentrasi bahan aktif sebanyak 5% yang merupakan konsentrasi ekstrak yang mulai memberikan efek pada hewan coba. Besarnya konsentrasi minimal didasarkan pada penelitian sejenis yang dilakukan oleh Fatimatuzzahro et al., (2020)	Timbangan	5 gram ekstrak dalam 100 gr gel	nomina 1
Gel asam kojic 1%	Sediaan semisolid yang homogen mengandung asam kojic dalam basis gel yang sama dengan ekstra kopi Robusta BP 42. Gel ini memiliki konsentrasi bahan aktif sebanyak 1 % yang merupakan konsentrasi bahan bahan aktif yang paling efektif memberikan efek sebagai sediaan topikal (Seedi, M.,et al (2019)	timbangan	1 gram asam kojic dalam 100 gram gel	nomina 1
Senyawa Bioaktif ekstrak kopi Robusta BP 42	Adalah senyawa-senyawa mayor dan minor yang terdeteksi dengan menggunakan 3 macam metode pada pemeriksaan dan merupakan senyawa penting yang diperlukan untuk proses perubahan pigmentasi pada skin graft	1.Liquid Chromatography/ Mass spectrometer (LC/MS) Merck/Tipe: SHIMADZU Spesifikasi: LCMS 2020 dengan SNI 01-3542-2004 2. GC-MS Instrumen GC-MS yang digunakan adalah GCMS-QP2010 Plus Shimadzu yang dilengkapi dengan splitless injektor yang diatur pada suhu 80°C.	Berupa kurva dan presentase luas area masing-masing senyawa bioaktif yang terkandung dalam ekastrak kopi Robusta BP 42	nominal

		3. Metode Gravimetri SNI 06-6989,102011		
Variabel Terikat Perlakuan Tahap I	Definisi Operasional	Alat Ukur	Hasil Pengukuran	Skala
Aktivitas hambatan tyrosinase ekstrak	Adalah kemampuan ekstrak untuk menghambat enzim tyrosinase dan dibandingkan dengan antityrosinase standard berupa asam kojic	Menggunakan metode Barubara modifikasi	absorbansi sampel diamati dengan microplate reader pada panjang gelombang 510 nm untuk menentukan persen inhibisi dan nilai konsentrasi hambat 50% (IC50).	nomina 1
Variabel Terikat perlakuan Tahap II	Definisi Operasional	Alat Ukur	Hasil Pengukuran	Skala
Jumlah Melanin	Jumlah melanin dalam sel melanosit akan tampak sebagai warna coklat gelap pada pewarnaan Masson Fontana dibagian basal dari lapisan epidermis. Timbulnya warna coklat gelap ini sebagai reaksi reduksi perak nitrat menjadi unsur perak	Metode analisis digital dengan software image J sesuai penelitian McMullec, <i>et al.</i> 2010	Jumlah melanin merupakan prosentase hasil perhitungan perlapangan pandang dalam satuan pixel yang dihitung dengan rumus: Pixel melanin dibagi Pixel epidermis X100%	Ratio

Derajat pigmentasi warna kulit	Warna kulit skin graft yang terlihat kasat mata dan dilakukan pemotretan dengan menggunakan kamera khusus	Software imaje J. Intensitas warna diukur menggunakan menu <i>Plugins-Analyze-RGB Measure</i> dengan menandai daerah merah menggunakan ikon <i>Rectangle</i> pada foto mengacu pada penelitian Fatimatuzzahra,2021.	Nilai rata-rata yang didapat dari perhitungan indikator skala $(R+G+B)/3$	Ratio
--------------------------------	---	---	---	-------

4.5 Bahan

Bahan yang digunakan dalam proses ekstraksi adalah

- a. Biji kopi varietas BP42 yang diambil 6-12 jam pasca panen dan telah diolah menjadi bentuk sediaan kering di Pusat Penelitian Kopi dan Kakao Jember
- b. Bahan membuat ekstrak adalah air, biji kopi robusta dan etanol 96%.
- c. Asam kojic yang digunakan pada penelitian ini adalah asam kojic 501-30-4 produksi dari Tokyo Chemical Industry co.Ltd(APAC)
- d. Bahan untuk membuat gel adalah Karbopol 2% dan propilen glikol 15% akuades 71% dan trietanolamin (TEA) 4%.
- e. Bahan pewarna untuk kadar melanin berupa pewarnaan Masson-Fontana terdiri dari silver stain kit specific to human skin melanin (Pharmaceuticals,America), gold chloride, 2% aq. sodium thiosulphate dan alkohol absolut, blok paraffin.
- f. Bahan untuk pemeliharaan hewan coba adalah makanan pelet, air tawar dan serbuk kayu.

- g. Enzim Tyrosinase from mushroom lyophilized powder T3824-25KU , Sigma - Alderich yang dipakai untuk uji aktifitas antitirosinase ekstrak kopi Robusta BP 42.

4.6 Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini terdiri dari:

- a. Alat untuk pemeliharaan marmut yaitu kandang dan alas kandang dari kawat, botol minum, tempat makan, dan penutup kawat dilapisi kassa sebagai penutup kandang.
- b. Alat untuk induksi ketamin yaitu gelas beaker, pengaduk, spuit, neraca ohaus, dan handscoon.
- c. Alat untuk membuat luka dan mengambil donor berupa pisau humby kecil dan pisau bedah dengan ukura mesh 15 , pinset,pot kulit dan handscoon, pisau cukur. Alat untuk menempel kulit donor yaitu gunting bedah, pinset, benang nylon ukuran 5.0, tulle kassa, transparan dressing. Berikut adalah gambar alat yang dimaksud:



Gambar 4. 2 Alat bedah

- d. Alat untuk pembuatan ekstrak kopi robusta (*Coffea canephora* L.) BP 42 adalah blender, ayakan, timbangan, maserator, *aluminium foil*, erlenmeyer, corong, kertas saring, pengaduk, *rotary evaporator* serta gelas ukur.

- e. Pembuatan gel membutuhkan alat beaker glass 50 mL, gelas ukur 10 mL, kasa steril, neraca ohaus dan lemari pendingin untuk menyimpan gel.
- f. Alat untuk membuat sediaan mikroskopis yaitu pisau scalpel, pinset, saringan, tissue casset, mesin processor otomatis, mesin vaccum, mesin bloking, freezer (-20°C), mesin microtome, pisau microtome, water bath 46 °C, kaca obyek, kaca penutup, rak khusus untuk pewarnaan, oven 60°C.
- g. Mikroskop adalah alat pembesar yang diperlukan untuk melihat sediaan histologis dan imunohistokimia dengan pembesar sampai ukuran 400x. Dengan mikroskop OLYMPUS seri BX 41 yang dilengkapi dengan kamera digital DP-70 dan memakai software OLYSIA merupakan mikroskop electron untuk pewarnaan Masson Fontana , Enzim tyrosinase dan IL-6. Fluoresensi dari sel yang telah diwarnai dengan dengan pewarnaan khusus akan tampak jelas dan memudahkan dalam penilaian.
- h. Spektrofometri adalah suatu instrument yang digunakan untuk mengukur absorbansi suatu sampel pada panjang gelombang tertentu. Spektrofotometer ini dapat digunakan untuk mengukur absorbansi pada panjang gelombang di daerah uv (200-400 nm) dan daerah visible (400-800 nm). Sampel yang dapat diuji dengan alat ini adalah sampel cair yang didalamnya mengandung senyawa yang bergugus kromofor dan dapat juga digunakan untuk sampel berwarna. Alat ini merupakan jenis spektrofotometer uv-vis single beam atau hanya memiliki satu berkas sinar. Spektrofotometer ini dilengkapi dengan berbagai fitur seperti LCD screen (128x64), Pengaturan panjang gelombang melalui papan tombol, Kompartemen sampel untuk pemegang sel yang khusus, Penyimpanan hasil hingga 200 metode dan 200 kurva standar.

- i. Software Image J adalah salah satu alat yang dipakai untuk menilai secara klinis ekspresi melanin pada kulit.
- j. Kamera untuk fotografi adalah alat yang dipakai untuk mengambil gambar secara klinis ekspresi melanin pada kulit dengan tingkatan pixel terbaik menggunakan kamera khusus yaitu kamera Nikon D4S dengan lensa makro 105 pada jarak 30cm.

4.7 Lokasi dan waktu Penelitian

Penelitian ini akan dilakukan di beberapa tempat. Pemilihan biji dan pembuatan simplisia di Pusat Penelitian Kopi dan Kakao Indonesia wilayah Jember. Pembuatan ekstrak kopi Robusta dan pembuatan formulasi sediaan gel kopi Robusta (*Coffea canephora*) BP 42 dilakukan di Laboratorium Farmasetika Fakultas Farmasi Universitas Jember. Sedangkan pembuatan preparat dan pemeriksaan histologis dengan mikroskop elektron dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember. Pelaksanaan penelitian direncanakan akan dilakukan pada bulan oktober sampai desember tahun 2022.

4.8 Prosedur Penelitian

4.8.1 Uji Kelayakan Etik

Subyek yang digunakan dalam penelitian ini adalah 30 ekor tikus Long-Evans yang dalam pelaksanaannya telah mendapatkan ijin etik dari Komisi Etik Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember dengan nomor 1657/UN25.8/KEPK/DL/2022 (Lihat Lampiran).

4.8.2 Proses Adaptasi Tikus

Tikus diadaptasikan selama empat minggu sebelum diberi perlakuan. Satu kandang diberi sekat pembatas dan berisi 2 tikus dengan ukuran kandang 50x80x40 sentimeter. Suhu pemeliharaan sebesar 27°C ($\pm 3^\circ\text{C}$). Siklus pencahayaan 12 jam terang dan 12 jam

gelap. Tikus diberi pakan standar dan diberikan air minum secara ad libitum yang ditimbang sesuai dengan kebutuhan setiap harinya.

4.8.3 Ekstraksi

Pembuatan ekstrak biji kopi Robusta BP-42 sesuai dengan prosedur ekstraksi metode maserasi yang dilakukan di Laboratorium Pusat Penelitian Kopi dan Kakao Jember. Kopi sebanyak 10 kg dihancurkan kemudian dikeringkan dengan cara diangin-anginkan. Setelah kering diblender untuk mendapatkan 1 kg serbuk simplisia. Sebanyak 200 gr serbuk simplisia diekstraksi dengan menggunakan pelarut etanol 96% dan ditutup dengan aluminium foil selama 18 jam. Kemudian hasil maserasi disaring dengan corong Buchner sehingga diperoleh filtrate 1 dan ampas 1. Residu diekstraksi ulang satu kali sehingga dihasilkan filtrat 2 dan ampas 2. Selanjutnya filtrate 1 dan filtrate 2 digabungkan dan dipekatkan dengan rotary evaporator pada suhu 30-40 °C sampai diperoleh ekstrak etanol kental dengan konsentrasi 5%.

4.8.4 Uji Karakterisasi Ekstrak Kopi

a. Penentuan Kadar Senyawa Bioaktif Ekstrak Kopi Robusta BP 42

- Penentuan Kadar Asam Klorogenat, Kafein, Trigonellin dengan LC-MS

Prinsip kerja Liquid Chromatography yaitu pemisahan komponen-komponen sampel dengan cara melewatkan sampel pada suatu kolom, yang selanjutnya dilakukan pengukuran kadar masing-masing komponen-komponen tersebut dengan detector Mass Spectrometry. Kerja detektor pada dasarnya membandingkan respon dari komponen sampel dengan respon dari larutan standar.

Penyiapan sampel untuk analisa kandungan kafein dan asam klorogenat

- Sampel ditimbang sebanyak 1 gr dan masukkan ke dalam erlenmeyer 100 mL
- Tambahkan 50 mL akuades ke dalam erlenmeyer tersebut
- Panaskan menggunakan hotplate stirer selama 20 menit pada suhu 100 °C
- Ambil filtrat dengan cara menyaring larutan tersebut menggunakan kertas Whatman No. 1

- Filtrat yang terpisah tersebut diambil menggunakan syringe dan difilter dengan menggunakan membrane filter (pore size $0,45\mu\text{ m}$, diameter 13 mm)
- Setelah difilter, encerkan filtrat sampel menggunakan akuades yang telah difilter. Kemudian filtrat yang telah diencerkan ditaruh ke dalam vial LC dan siap untuk dianalisa menggunakan LCMS

Optimasi kondisi injeksi LCMS (analisa kafein)

Kolom = Water C18
 Eluen = Metanol : akuades + as.format 2% (50 : 50)
 Volume injeksi = $10\ \mu\text{l}$
 Flow rate = $1,0\ \text{mL}/\text{min}$
 Temperatur = 40°C

Optimasi kondisi injeksi LCMS (analisa asam klorogenat)

Kolom = Water C18
 Eluen = Metanol : akuades + as.format 2% (25 : 75)
 Volume injeksi = $10\ \mu\text{l}$
 Flow rate = $1,0\ \text{mL}/\text{min}$
 Temperatur = 40°C

Optimasi kondisi injeksi LCMS (analisa Trigonellin)

Kolom = Water C18
 Eluen = Metanol : akuades + as.format 2% (25 : 75)
 Volume injeksi = $10\ \mu\text{l}$
 Flow rate = $1,0\ \text{mL}/\text{min}$
 Temperatur = 40°C

- **Penentuan kadar Lemak ekstrak kopi Robusta BP 42 dengan Metode Gravimetri**

Prinsip analisis gravimetri ialah yang didasarkan pada pengukuran berat, yang melibatkan pembentukan isolasi dan pengukuran berat dari suatu endapan. Untuk Analisa lemak pada penelitian ini menggunakan pelarut n – heksan, ether atau kloroform .

- **Penentuan Kadar senyawa bioaktif ekstrak kopi Robusta BP 42 melalui analisis profiling dengan GC-MS**

Analisis komposisi komponen volatil terdiri dari :

Identifikasi dan penentuan kandungan komponen volatil yang diperoleh dengan GC-MS. Tahapan pekerjaan meliputi :

- 1) preparasi sampel dengan melarutkan masing-masing sampel menggunakan pelarut etanol p.a (filter sampel dengan syringe filter membran)
- 2) injeksi sampel ke perangkat GC-MS, dan
- 3) penentuan kualitatif komponen volatil.

Analisis komposisi komponen volatil dengan GC-MS

Instrumen GC-MS yang digunakan adalah GCMS-QP2010 Plus Shimadzu yang dilengkapi dengan splitless injektor yang diatur pada suhu 80°C. Suhu detektor MS 280°C. Kolom Rtx-50 (dengan diameter dalam 0.25 mm, panjang 30 m dan ketebalan 0.25 µm yang mengandung 50% phenyl - 50% methyl polysiloxane). Suhu detektor diprogram pada suhu awal 80 °C selama 10 menit kemudian dinaikkan sampai 290°C selama 10 menit dengan kecepatan 5°C/menit. Helium digunakan sebagai gas pembawa dengan kecepatan 3 mL/menit. Sampe

b. Uji Hambatan Tirosinase

Uji Hambatan tyrosinase mengacu kepada metode batubara dengan metode optimasi dari dewi. Secara rinci uji hambatan tyrosinase ini meliputi beberapa persiapan yaitu:

- a. Larutan ekstrak dibuat dengan 6 konsentrasi yaitu 52 ppm, 102 ppm, 156 ppm, 204 ppm, 260 ppm, dan 306 ppm. Pembuatan diawali dengan membuat larutan induk 520 ppm dan 1020 ppm terlebih dahulu. Untuk membuat larutan induk 520 ppm, ditimbang 5,2 mg ekstrak kemudian ditambahkan dengan DMSO 1% (0,1 ml) untuk membantu kelarutan ekstrak dengan pelarut. Setelah itu, dilarutkan dengan dapar fosfat pH 6,5 sampai 10 ml. Untuk membuat larutan induk 1020 ppm, ditimbang 10,2 mg ekstrak kemudian ditambahkan dengan

DMSO 1% (0,1 ml) untuk membantu kelarutan ekstrak dengan pelarut. Setelah itu, dilarutkan dengan dapar fosfat 6,5 sampai 10 ml. Selanjutnya, larutan induk yang telah dibuat diencerkan dengan dapar fosfat pH 5,6 untuk mendapatkan larutan dengan konsentrasi 52 ppm, 102 ppm, 156 ppm, 204 ppm, 260 ppm, dan 306 ppm.

b. Pembuatan larutan Asam kojic

Larutan asam kojic dibuat dalam 6 konsentrasi yaitu 0,05 mM, 0,1 mM, 0,15 mM, 0,2 mM, 0,25 mM, dan 0,3 mM (setara dengan 7, 14, 21, 28, 35, 42 ppm). Pembuatan diawali dengan membuat larutan induk asam kojic 1 mM dengan cara ditimbang 1,4 mg asam kojic dan dilarutkan dalam 10 ml dapar fosfat pH 5,6. Setelah itu, larutan induk yang telah dibuat diencerkan dengan dapar fosfat pH 5,6 untuk mendapatkan larutan dengan konsentrasi 0,05 mM, 0,1 mM, 0,15 mM, 0,2 mM, 0,25 mM, dan 0,3 mM.

c. Pembuatan larutan substrat L-Tirosin.

Larutan induk L-Tirosin dibuat dengan menimbang 18,119 mg L-Tirosin dan dilarutkan dalam 10 ml dapar fosfat pH 6,5 sehingga didapatkan L-Tirosin 10 mM. Kemudian larutan induk diencerkan dengan memipet 1 ml larutan induk kemudian diadkan dengan dapar fosfat pH 6,5 hingga volume 10 ml sehingga didapatkan larutan L-Tirosin 1 mM. Pengenceran enzim dalam satu botol enzim dengan berat 2,94 mg mengandung 8503 unit/mg. Enzim tersebut kami larutkan dalam dapar fosfat pH 6,5 sebanyak 10 ml sehingga didapatkan konsentrasi 2.499, 882 unit/ml. Setelah itu, larutan tirosinase diencerkan dengan dapar fosfat pH 6,5 hingga 10 ml sehingga didapatkan konsentrasi 500 unit/ml. Selanjutnya, dibuat turunan kedua dengan diencerkan menggunakan dapar fosfat Ph 6,5 sebanyak 10 ml sehingga didapatkan konsentrasi 350 unit/ml. 5

- d. Pengujian hambatan tirosinase Pada masing-masing lubang 96-well plate ditambahkan larutan ekstrak atau standar asam kojic sebanyak 70 μL dan ditambahkan 40 μL enzim tirosinase (350 unit/mL) kemudian diinkubasi selama 5 menit pada suhu ruang. Setelah diinkubasi, pada masing- masing lubang ditambahkan 110 μL L-tirosin 1 mM dan diinkubasi selama 45 menit pada suhu ruang. Waktu inkubasi ini didasarkan pada percobaan kinetika yang dilakukan. Selanjutnya, absorbansi sampel diamati dengan microplate reader pada panjang gelombang 510 nm untuk menentukan persen inhibisi dan nilai konsentrasi hambat 50% (IC50).

4.8.5 Pembuatan Gel Ekstrak kopi Robusta BP 42 dan Gel Asam Kojic 1 %

Karbopol 2% dan propilen glikol 15% dikembangkan dengan sebagian akuades 71%. Kemudian trietanolamin (TEA) 4% dimasukkan tetes demi tetes ke dalam karbopol dan propilen glikol yang telah dikembangkan. Aduk hingga homogen dan tambahkan sisa aquades hingga membentuk masa gel yang homogen. Masukkan sedikit basis gel sebanyak 27,6 gram ke dalam lumpang, kemudian ekstrak kering biji kopi Robusta 5% masing-masing sebanyak 5 gram ditambahkan dan digerus homogen dan didapatkan gel ekstrak biji kopi sebanyak 100 gram ekstrak kopi Robusta.

Pembuatan gel asam kojic 1% prinsipnya sama dengan pembuatan ekstrak kopi Robusta BP 42 . Pada saat basis gel telah terbentuk makan ditambahkan 1 gram asam kojic ke dalam 99 gram gel untuk mendapatkan konsentrasi asam kojic 1% dalam 100 gram gel. Berikut adalah gambar ketiga gel yang digunakan dalam penelitian ini:



Gambar 4. 3 Gel yang digunakan dalam perlakuan pada tikus

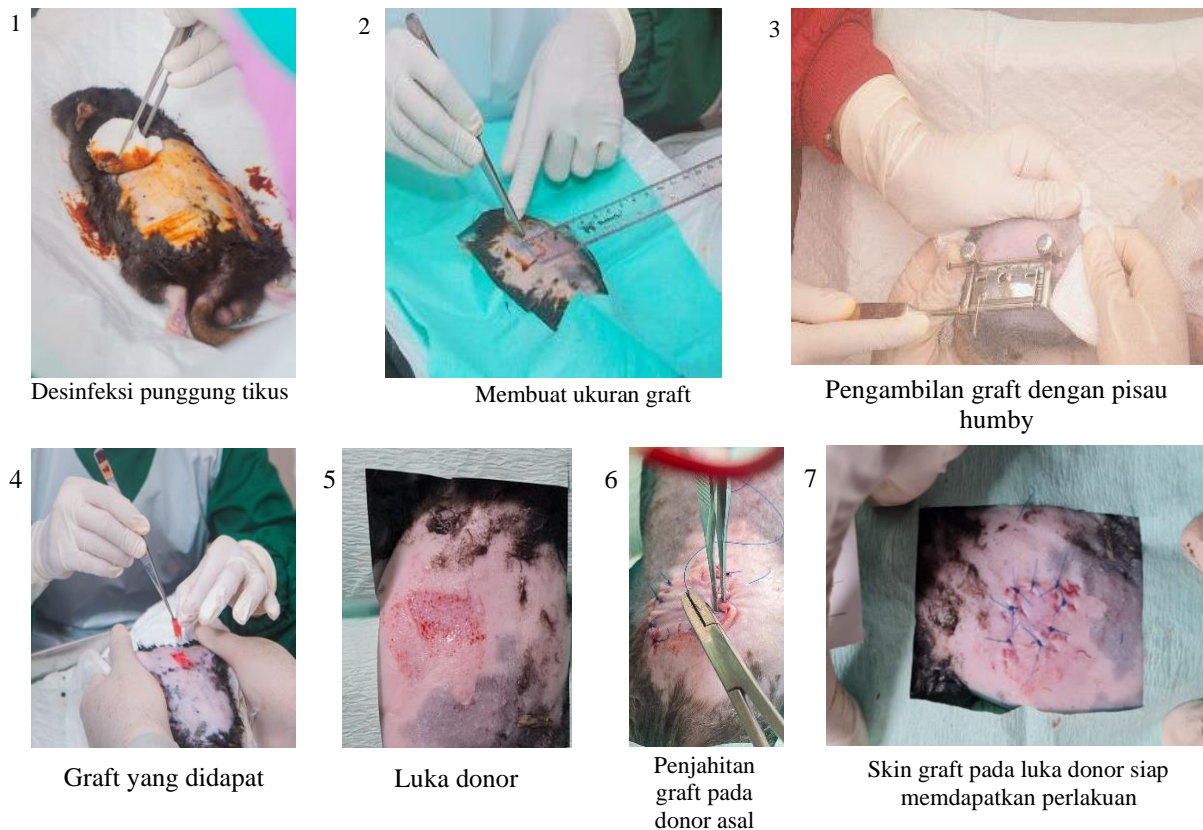
4.8.6 Tahap Perlakuan

a. Induksi luka *Split thickness skin graft*

Kulit punggung tikus dipersiapkan untuk operasi. Kulit ini kemudian desinfeksi dengan Betadine Veterinary Surgical dan alkohol 70%. Sebuah luka eksisional dengan diameter penuh 20 mm (2cm) dibuat pada dorsum tikus menggunakan pisau Humby. Luka Split thickness dibuat diatas dari fascia dengan mengambil sebagian ketebalan kulit.

b. Pengambilan Skin graft

Pertama, tikus dibius dengan menggunakan ketamin 35.0 mg/kg Ketamine dan 5.0 mg/kg Xylazine in the gluteal area. Setelah terbius kemudian dicukur rambut di daerah dorsal dengan hati-hati. Dengan cara ini, cangkok kulit halus dan tidak berambut diperoleh. Kulit didesinfeksi dan diminyaki dengan bantuan kain kasa berlemak. Menggunakan penanda steril, panjang graft yang diinginkan dipilih. Kebutuhan lebar dan ketebalan cangkok disesuaikan. Pelat penyangga yang disiapkan dipegang di samping tikus dan kulit dimobilisasi dan ditarik ke samping perangkat, sampai titik yang ditandai berada di tengah piring. Dengan tangan yang tidak dominan, kulit terpaku pada bagian bawah pelat. Selanjutnya kulit siap untuk diambil menggunakan humby.⁴⁶ Langkah pengambilan skin graft secara rinci dapat dilihat pada gambar di bawah ini



Gambar 4. 4 Langkah dalam Skin Grafting

c. Perawatan Luka

Luka donor akan menjadi resipien dari skin graft dibersihkan. Luka yang ditemplei skin graft langsung mendapatkan gel dimana kelompok 1 akan diolesi dengan gel kosong , kelompok 2 dengan gel dengan ekstrak kopi Robusta BP 42 dan kelompok 3 diolesi dengan gel yang mengandung asam kojic 1%. Area yang telah diolesi dengan gel yang banyaknya gel berkisar antara 0,10-0,15 tergantung dengan luas graft .Kemudian ditutup dengan akan dipasangi tie over direkatkan lagi dengan dengan plester luar yang tidak terlepas dan menyebabkan iritasi. Plester dan tie over dibuka pada hari ke 4 untuk semua kelompok. Perawatan luka dilakukan 3-4 hari. Untuk mencegah terjadinya infeksi dan kematian dari tikus maka pemberian antibiotik selama

3 hari. Selama masa penelitian, hewan coba dicegah agar tidak menggaruk, melepas, memakan ataupun menjilat gel yang telah dioleskan. Kandang tikus dibersihkan dan diganti alasnya setiap hari dan diikuti dengan sinar UV ruangan untuk menurunkan risiko infeksi. Selain itu, di dalam satu kandang hanya berisi dua sampai tiga dan diantaranya diberikan sekat agar tikus tersebut tidak saling menggigit luka satu sama lain.

4.8.7 Pembuatan Sediaan Histologis

Pemeriksaan histologis dilakukan pada hari ke-7, 14, 21 dari awal perlakuan. Sediaan histologis ini selanjutnya diwarnai dengan pewarnaan Masson Fontana. Deteksi noda Fontana-Masson melanin menggunakan kit pewarnaan perak khusus untuk melanin kulit manusia (Farmasi, Amerika) digunakan. Proses berikut adalah deparafinasi bagian jaringan yang tertanam parafin (4 mm) dengan cara ditempatkan dalam air suling dan diolah dengan larutan perak amoniak dalam botol tertutup selama 15 menit.

Bagian dicek secara mikroskopis dan langkahnya diulang bila diperlukan. Sampel dicuci dengan baik dalam air suling, diwarnai dengan emas klorida selama 2 menit, dicuci lagi dengan air suling dan difiksasi dalam 2% aq. natrium tiosulfat selama 2 menit. Sediaan dicuci lagi dengan air suling, diimbangi dengan pewarna Ponceau selama 3 menit, dibilas dalam air suling, dengan cepat didehidrasi dalam alkohol absolut, dibersihkan dan dipasang. Melanin dapat dilihat sebagai nodan hitam dibawah mikroskop. Bagian yang menunjukkan hasil positif difoto dan dianalisis menggunakan piranti lunak software image J.

4.9 Analisis Data

- Analisa data Aktifitas enzim

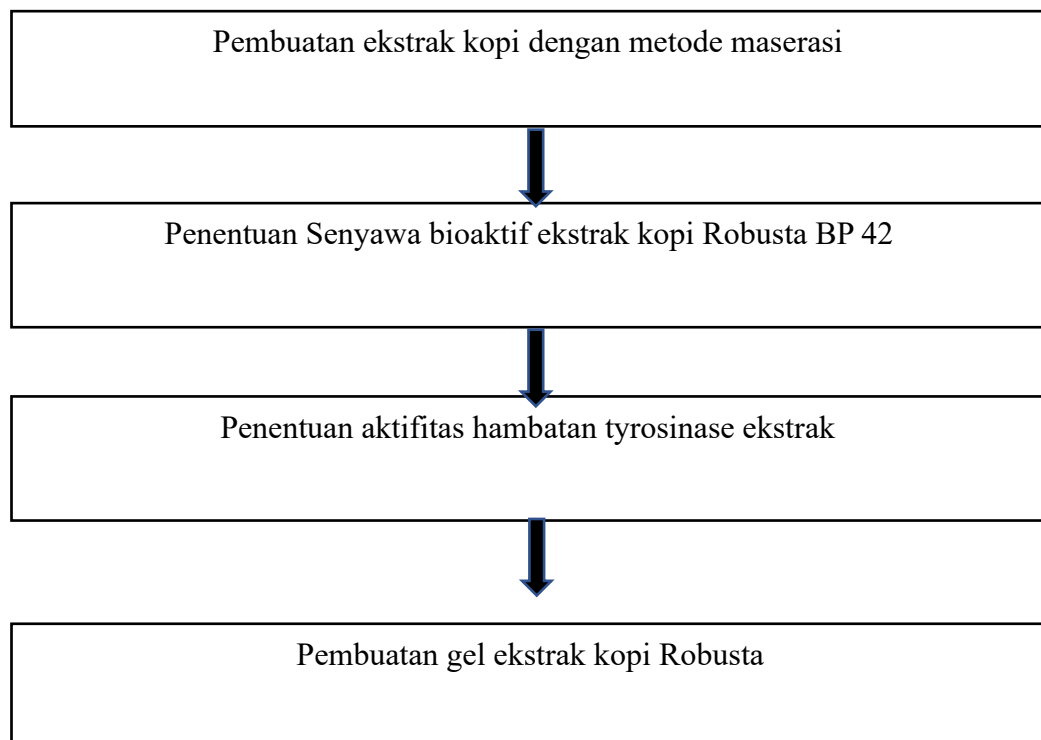
Dari hasil pengamatan yang diperoleh, data uji aktifitas enzim diolah menggunakan aplikasi SPSS 16.0. Hasil dianalisis secara statistik dengan menggunakan Shapiro-Wilk untuk menguji normalitas data dan Levene's test untuk menguji homogenitas data. Kemudian jika distribusi data normal dan homogen, dilanjutkan dengan analisis statistik One Way ANOVA. Namun, jika distribusi data tidak normal atau tidak homogen, dilanjutkan dengan analisis statistik Kruskal-Wallis. Apabila terdapat perbedaan yang signifikan maka dapat diteruskan dengan analisis statistik Post Hoc.

- Analisa data tahap 2

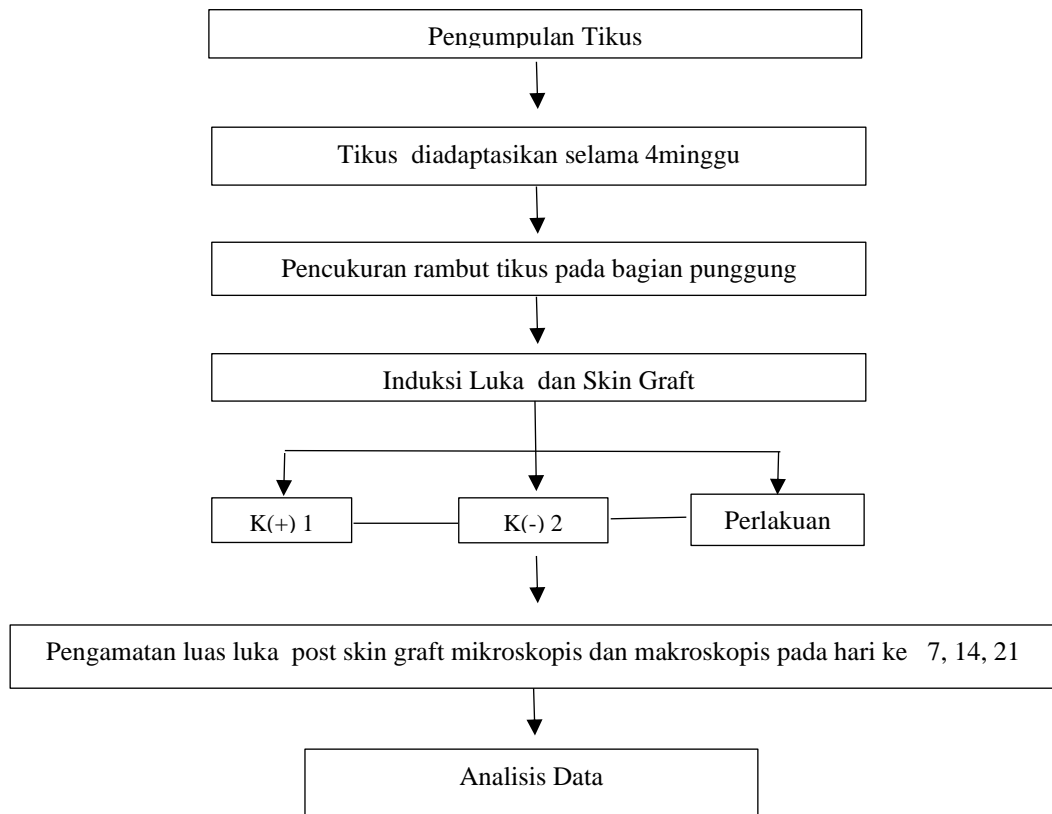
Analisis statistik pada tahap ini bertujuan untuk mencari hubungan antara variabel independent berupa jumlah dosis ekstrak, volume gel yang diberikan dan lamanya pemberian gel pada graft. Penggunaan metode mixed repeated -measures factorial ANOVA dianggap metode yang paling tepat.

4.9 Kerangka Operasional Penelitian

Penelitian tahap 1:



Penelitian tahap 2:



BAB V HASIL DAN PEMBAHASAN

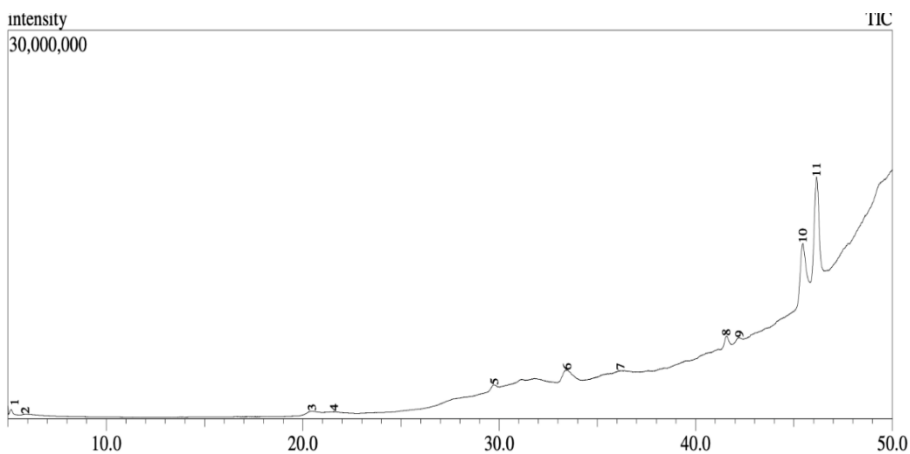
5.1 Hasil Penelitian Tahap 1

5.1.1 Pemeriksaan Senyawa Bioaktif Ekstrak Kopi Robusta BP 42

Pada tahap ini penelitian bertujuan untuk menentukan kandungan senyawa kimia bioaktif dari kopi robusta BP 42 menggunakan kombinasi teknik LCMS , GC-MS dan metode gravimetri. Pemeriksaan LC-MS digunakan untuk mengetahui kadar asam klorogenat, kafein dan trigonelline sedangkan kandungan lemak menggunakan metode gravimetri. Hasil analisa 4 senyawa kimia dari ekstrak kopi tampak pada tabel 5.1 dan gambar 5.1 dibawah ini.

Tabel 5. 1 Hasil analisa ekstrak kopi Robusta BP 42

Hasil Uji Ekstrak Kopi Robusta (dalam%)			
Metode Gravimetri	Metode LC-MS		
Lemak	Asam klorogenat	Kafein	Trigonellin
8,911	8,164	2,029	0,666



Peak Report TIC				
Peak#	R.Time	Area	Area%	Name
1	5.006	3704576	1.06	.EPSILON.-RHODOMYCINONE
2	5.883	2124032	0.61	Pyridine (CAS) Azine
3	20.464	14801352	4.25	Benzenesulfonic acid, 4-hydroxy- (CAS) Ber
4	21.584	5531772	1.59	Phenol, 2-methoxy- (CAS) Guaiacol
5	29.753	12455995	3.58	Phenol, 4-ethenyl-2-methoxy-
6	33.479	37178104	10.68	1,4-Benzenediol (CAS) Hydroquinone
7	36.183	3969041	1.14	Oleic acid
8	41.561	12560845	3.61	2-Propenoic acid, 3-(4-methoxyphenyl)-, eth
9	42.220	5824400	1.67	Methyl palmitate
10	45.460	109318166	31.40	Palmitic acid
11	46.151	140648399	40.40	Caffeine
		348116682	100.00	

Gambar 5. 1 Hasil analisis profiling ekstrak kopi robusta dengan menggunakan metode GC-MS

Berdasarkan tabel 5.1 diatas diketahui bahwa kandungan lemak pada ekstrak kopi robusta BP 42 memiliki kadar yang paling tinggi bila dibandingkan dengan tiga senyawa lainnya.. Sedangkan Trigonelline merupakan senyawa bioaktif dengan kadar yang paling kecil pemeriksaan senyawa mayor ekstrak kopi Robusta BP 42 ini. Keempat senyawa bioaktif mayor ini tidak hanya hanya ditemukan pada kopi robusta tetapi juga terdapat pada jenis kopi arabika.

Berdasarkan metode GS-MS yang tampak pada gambar 5.1 diatas menunjukkan bahwa ada sebelas senyawa bioaktif yang dapat terdeteksi pada pemeriksaan ini, dimana kafein merupakan kandungan senyawa kimia yang paling banyak kadarnya dengan luas area sebesar 40,40%. Senyawa terbanyak kedua dan ketiga adalah asam palmitic dan senyawa 1,4 Benzenediol hydroquinone. Pada metode GC-MS ini asam klorogenat tidak muncul dalam kurva karena GCMS adalah alat yang digunakan untuk menguji senyawa yang sifatnya volatile sedangkan asam klorogenat merupakan asam yang tidak mudah menguap/non volatile. Pada sistem GCMS pemanas yang disetting pada bagian oven dan injector port serta fase gerak helium menyebabkan hanya senyawa yg ter volatilkan saja yang dapat terdeteksi. Kafein, lemak dan senyawa lainnya yang memiliki sifat tahan/ stabil terhadap pengaruh panas hingga suhu 315 derajat celcius, itu sebabnya senyawa-enyawa ini dapat terdeteksi secara jelas pada pemeriksaan GC-MS ini.

5.1.2 Uji Hambatan Tirosinase

Aktivitas penghambatan enzim tirosinase ditunjukkan dengan nilai IC_{50} . Konsep nilai konsentrasi pada penghambatan 50% (IC_{50}) banyak digunakan dalam dunia farmasi sebagai ukuran efektivitas dalam menghambat suatu fungsi biologis atau biokimia. IC_{50} yaitu konsentrasi yang dapat menghambat 50% (setengahnya) aktivitas

enzim. Nilai IC_{50} penting untuk mengetahui seberapa besar potensi inhibitor dalam menghambat reaksi enzimatik. Semakin kecil nilai IC_{50} yang dihasilkan maka semakin besar potensi suatu inhibitor dalam menghambat aktivitas enzim tyrosinase. Untuk mendapatkan nilai penghambatan 50% maka perlu diketahui % hambatan masing-masing konsentrasi yang dihitung menggunakan rumus:

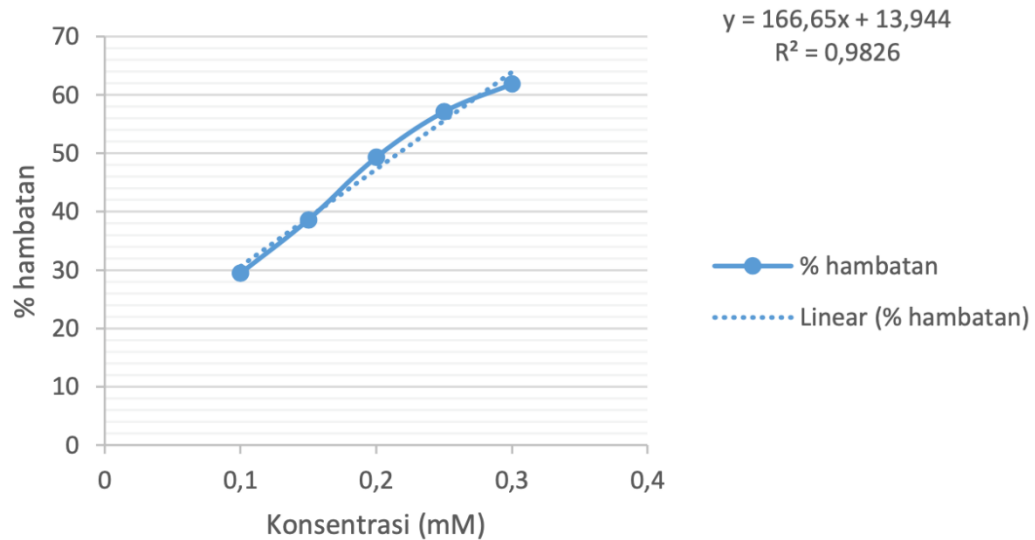
$$(\%) \text{ Persen Hambatan} = \frac{\text{Absorbansi kontrol negatif} - \text{Absorbansi kojic acid}}{\text{Absorbansi kontrol negatif}} \times 100$$

Pada penelitian ini uji hambatan tyrosinase ekstrak kopi Robusta BP 42 dibandingkan dengan asam kojic sebagai salah satu bahan standard yang memiliki kemampuan hambatan tyrosinase. Hasil perhitungan nilai rata-rata konsentrasi hambatan asam kojic dapat dilihat pada tabel 5.2 berikut ini:

Tabel 5.2 Rata-rata % hambatan tyrosinase asam kojic terhadap L-tirosinase dan Uji Anova

Konsentrasi (mM)	n	Mean \pm SD (%)	P-value
0,1	3	29,4 \pm 3,2	0,000
0,15	3	38,5 \pm 5,7	
0,2	3	49,4 \pm 5,1	
0,25	3	57,1 \pm 8,5	
0,3	3	61,8 \pm 38,4	

Berdasarkan tabel di atas nilai % hambatan tyrosinase meningkat seiring peningkatan konsentrasi asam kojic. Bila digambarkan dengan kurva maka akan tampak seperti gambar 5.2 berikut ini:



Gambar 5. 2 Kurva hambatan asam kojic. Kurva hambatan asam kojic terdiri dari sumbu x adalah konsentrasi dan sumbu y adalah % hambatan, sehingga didapatkan persamaan garis yaitu $y = 166,65x + 13,944$

Berdasarkan gambaran persamaan kurva hambatan tirosinase asam asam kojic diatas diperoleh nilai konsentrasi hambat 50% (IC50) asam kojic adalah 0,216 mM .

Analisis statistic dengan uji anova one way menunjukkan bahwa terdapat perbedaan % hambatan tirosinasi pada masing-masing konsentrasi asam kojic dan terdapat perbedaan bermakna pada rerata persentase hambatan antar konsentrasi asam kojic sebagaimana tampak pada tabel 5.3 dibawah ini.

Tabel 5 3 Uji post hoc antar kelompok konsentrasi asam kojic

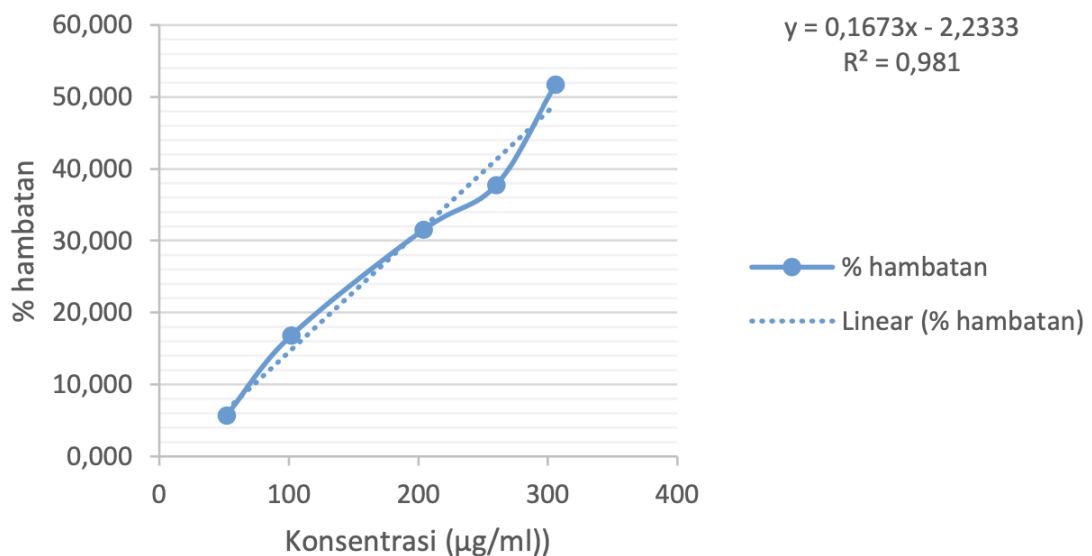
Konsentrasi (mM)	Mean difference	P-value
0,1 vs 0,2	-20	0,015
0,1 vs 0,25	-27,7	0,001
0,1 vs 0,3	-32,4	0,000
0,15 vs 0,25	-18,6	0,023
0,15 vs 0,3	-23,3	0,015

Hasil uji hambatan ekstrak kopi Robusta BP 42 menunjukkan hasil yang sama dengan asam kojic dimana terjadi peningkatan hambatan tirosinase seiring dengan peningkatan konsentrasi ekstrak kopi. Hasil uji one way anova menunjukkan bahwa terdapat perbedaan bermakna pada masing-masing kelompok konsentrasi ekstrak seperti tertulis dalam tabel 5.4 dibawah ini:

Tabel 5 4 Rata-rata % hambatan tirosinase ekstrak kopi BP-42 terhadap L-tirosinase dan Uji Anova

Konsentrasi (ppm)	n	Mean \pm SD (%)	P-value
52	3	5,8 \pm 0,1	0,000
102	3	16,7 \pm 2,4	
204	3	31,4 \pm 3,9	
260	3	37,6 \pm 1,8	
306	3	51,5 \pm 6,5	

Bila digambarkan dengan kurva liner maka akan tampak seperti gambar 5.3 dibawah.



Gambar 5. 3 Kurva hambatan ekstrak kopi robusta BP-42

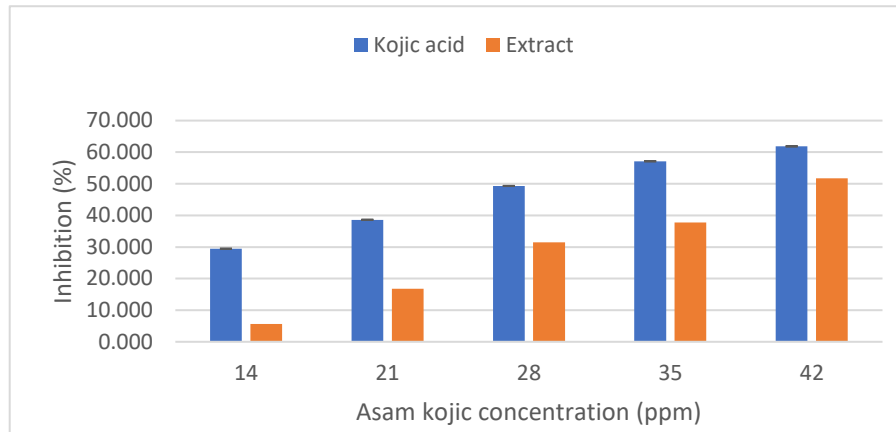
Sedangkan hasil uji statistik antar kelompok pada ekstrak kopi Robusta BP 42 menunjukkan hasil yang berbeda dengan asam kojic dimana tidak terdapat perbedaan

signifikan penghambatan antara kelompok konsentrasi ekstrak kopi 52 ppm dengan kelompok konsentrasi ekstrak 102 ppm dan kelompok konsentrasi ekstrak kopi 204 ppm dengan kelompok konsentrasi ekstrak 306 ppm. Mengacu pada gambaran persamaan kurva hambatan ekstrak kopi robusta diatas maka diperoleh nilai konsentrasi hambat 50% (IC50) ekstrak adalah 312,213 ppm.

Tabel 5. 5 Hambatan tirosinase asam kojic vs ekstrak kopi robusta BP-42

Konsentrasi (ppm)	Mean difference	P-value
52 vs 102	-10,9	0,050
52 vs 204	-25,6	0,024
52 vs 260	-31,8	0,004
52 vs 306	-45,7	0,021
102 vs 204	-14,6	0,037
102 vs 260	-20,9	0,002
102 vs 306	-34,8	0,021
204 vs 306	-20,1	0,066

Berdasarkan hasil penelitian ini didapatkan bahwa kemampuan % hambatan terhadap tirosinase dari asam kojic lebih kuat dibandingkan dengan ekstrak kopi Robusta Bp 42. Untuk dapat menimbulkan efek yang minimal sama kuatnya dengan asam kojic maka perlu peningkatan ekstrak 10x lebih banyak. Secara rinci gambaran perbedaan kekuatan % hambatan dapat dilihat pada gambar 5.4 berikut ini:



Gambar 5. 4 Perbedaan kekuatan % hambatan antara asam kojic dibandingkan dengan ekstrak kopi Robusta BP 42

5.1.3 Pembahasan

Banyak metode yang dipakai untuk menganalisis komponen bioaktif kopi. Pemilihan metode sangat tergantung pada jenis senyawa bioaktif yang akan diteliti. *High-performance liquid chromatography* (HPLC), spektrofotometri ultraviolet, dan teknik voltametri merupakan jenis metode analisis utama yang digunakan dan diterapkan untuk mengukur senyawa bioaktif utama dari sampel kopi seperti asam klorogenat, kafein, trigonelline, asam nikotinin, diterpenes dan asam karboksilat rantai pendek.^{47,48} Gravimetri merupakan salah satu dari 2 standard pemeriksaan lemak yang banyak dipakai untuk melakukan identifikasi kandungan senyawa lemak pada kopi.⁴⁹ Sedangkan GC/MS akan sangat penting untuk melengkapi penelitian sebelumnya dan mengungkap karakter metabolit dari kopi karena dapat menganalisis partikel yang sangat kecil dan tidak merusak sampel.⁵⁰

Hasil penelitian ini telah membuktikan bahwa komponen senyawa bioaktif mayor ekstrak kopi Robusta BP-42 seperti asam klorogenat mempunyai kadar 8,16. Nilai ini sedikit lebih tinggi dibandingkan dengan penelitian sebelumnya yang menyebutkan kadar asam klorogenat umumnya pada kopi sebesar 8% dan kadarnya lebih kecil pada kopi yang disangrai karena selama penyangraian sebagian besar asam klorogenat

menjadi asam kafeat dan asam kuintat.⁵¹ Kandungan asam klorogenat total biji kopi hijau dapat bervariasi tidak hanya menurut genetika — spesies tetapi juga tingkat pematangan, praktik pertanian, iklim, dan tanah mempengaruhi kandungan senyawa tersebut.

Pada penelitian ini kadar kafein ekstrak kopi Robusta BP 42 sebesar 2,029 % . Hasil ini sejalan dengan penelitian sebelumnya yang menyebutkan bahwa kadar kafein pada kopi robusta umumnya memiliki kadar antara 1,5 – 4%. Konsentrasi kafein dalam biji kopi ini juga sangat bergantung pada spesiesnya.⁴⁸ Senyawa mayor lain yang teridentifikasi pada penelitian ini adalah trigonelline dengan kadar sebesar 0,666%. Hasil temuan ini sama dengan penelitian sebelumnya yang melaporkan bahwa kadar trigonelline (N-methylnicotinic acid) pada kopi hijau antara 0,6% dan 50%. Komponen ini akan terurai selama penyangraian dan menghasilkan degradannya berupa asam nikotinat, piridin, 3-metil piridin, asam nikotinat, metil ester, dan senyawa lainnya.⁵²

Kandungan senyawa penting lainnya adalah lemak. Asam linoleat adalah asam lemak yang dominan, diikuti oleh asam palmitat. Kadar lemak kopi robusta pada umumnya berkisar antara 9-13%. Penelitian yang lain membuktikan bahwa kadar lemak pada kopi Robusta Jawa rata-rata sebesar 10,67% dan Robusta Gayo sebesar 13,15%. Pada penelitian ini kandungan lemaknya mencapai nilai 8,91% lebih rendah dibandingkan dengan temuan sebelumnya dengan komposisi lemak yang paling dominan adalah asam palmitat dibandingkan dengan asam linoleate. Kualitas kopi mempengaruhi secara langsung pada kandungan kadar lemak. Jenis kopi eksalta dengan kualitas cacat mempunyai kadar yang paling rendah dibandingkan dengan kopi kualitas normal dari arabika dan robusta.⁵³

Senyawa minor lain yang memiliki jumlah yang cukup tinggi pada penelitian ini berdasarkan analisis profiling GC-MS adalah senyawa 1,4 Benzenediol hydroquinone.

Hasil penelitian ini sesuai dengan penelitian sebelumnya yang menemukan adanya kandungan hidrokuinon pada senyawa primer yang menentukan aroma kopi.⁵⁴ Penelitian lain yang memperkuat hasil penelitian ini adalah penelitian yang dilakukan oleh Hasan dkk(2022) yang membuktikan bahwa biji kopi Robusta asal Wonosobo mengandung bahan aktif seperti asam klorogenat, flavonoid, dan hidrokuinon hidroksi.⁵⁵

Senyawa bioaktif pada kopi telah terbukti memiliki beberapa efek farmakologi antara lain sebagai imunomodulator, antivirus, antijamur, antioksidan, antiinflamasi dan antibakteri serta aktivitas antitirosinase. Adanya efek farmakologi sebagai antitirosinase memberikan peluang kopi sebagai alternatif terapi untuk dikombinasikan dengan modalitas yang ada atau bahkan menjadi terapi tunggal bahan alami yang dipakai untuk bahan depigmentasi. ^{56,57} Adapun senyawa bioaktif yang banyak dikaitkan dengan efek antitirosinase adalah asam klorogenat, dan kafein.

Asam klorogenat dan kafein di dalam kopi telah diteliti tidak hanya memiliki aktivitas sebagai antioksidan akan tetapi juga memiliki aktivitas antitirosinase. Kemampuan sebagai antitirosinase melalui mekanisme sinergisitas. Senyawa ini berafinitas pada enzim tirosinase sehingga pembentukan dopachrome terganggu dan reaksi tidak berlanjut ke langkah selanjutnya.

Senyawa-senyawa bioaktif lainnya dari ekstrak kopi Robusta yang diduga berkaitan dengan mekanisme pigmentasi adalah golongan hidrokuinon, trigonelline, dan asam lemak terutama asam linoleac. Trigonellin dan asam lemak ini diduga mempengaruhi proses pigmentasi melalui jalur antioksidan dan antiinflamasi. Sedangkan kandungan hidrokuinon diduga secara kompetitif menghambat sintesis melanin dengan membuat ikatan kovalen secara histone, berinteraksi dengan tembaga di situs aktif, dan bertindak sebagai substrat yang buruk untuk tirosinase. Hidrokuinon

dapat menyebabkan kerusakan permanen pada melanosom dan melanosit oleh radikal bebas semiquinone yang dihasilkan selama reaksi enzimatik.⁵⁸

Temuan sebelumnya ini mendukung hasil penelitian ini dimana berdasarkan uji hambatan aktifitas tirosinase secara *in vitro* pada enzim L-tirosinase menunjukkan bahwa ekstrak kopi robusta yang berasal dari Jember memiliki kemampuan sebagai antitirosinase meskipun lebih rendah dibandingkan dengan asam kojic yang merupakan salah satu standard antitiosinase. Adanya hasil yang positif ini membuktikan bahwa ekstrak kopi robusta memiliki peluang untuk terus dikembangkan sebagai bahan skin lightening.

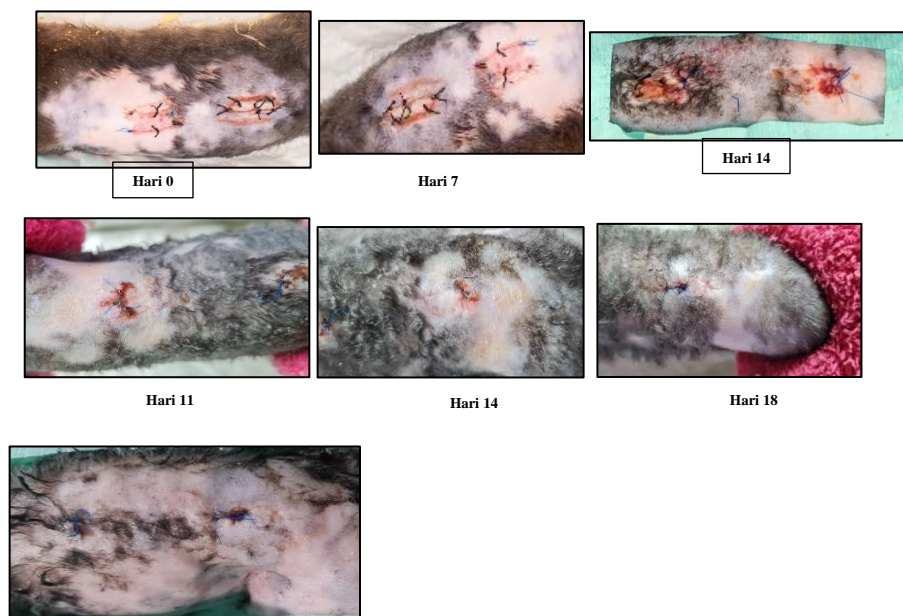
5.2 Hasil Penelitian Tahap 2

Pada tahap ini penelitian bertujuan untuk membuktikan efek pemberian gel ekstrak kopi Robusta BP 42 terhadap proses pigmentasi penyembuhan luka skin graft. Ekstrak kopi robusta BP 42 diaplikasikan secara topikal dalam bentuk gel. Pemilihan bentuk sediaan gel dikarenakan gel memiliki keunggulan yang dapat memberikan rasa dingin, nyaman dan mampu menerima respon dari lingkungan eksternal sehingga pelepasan bahan aktif terkontrol serta bisa mengendalikan proses penyembuhan luka²¹. Penggunaan gel ekstrak kopi ini telah terbukti pada penelitian sebelumnya mampu membantu meningkatkan pertumbuhan epitel pada proses penyembuhan luka bakar dan meningkatkan jumlah osteoblas dan menurunkan osteoklas pada tulang alveolar pada proses penyembuhan luka periodontitis tikus^{19,20}

Evaluasi skin graft dilakukan pada hari ke 4. Penetapan hari keempat ini mengacu pada fisiologi penyembuhan skin graft dan penelitian pendahuluan yang dilakukan dimana evaluasi graft memberikan hasil yang optimal pada hari ke-4 dikarenakan proses pembentukan pembuluh darah sudah terjadi dan adanya hubungan yang adekuat

antara sisi donor dan resipien. Sedangkan perawatan luka lanjutan dilakukan tiap tiga atau empat hari sekali yang mengacu pada uji coba sebelumnya. Hasil uji coba menunjukkan bahwa perawatan luka yang dilakukan setiap hari atau dua hari sekali menyebabkan luka skin graft bergeser dan sebagian besar mengalami infeksi serta tikus menjadi lebih stres sehingga banyak tikus yang mati sebelum menyelesaikan masa evaluasinya. Oleh karena itu dicoba perawatan tiap tiga atau empat hari sekali dan ternyata memberikan hasil yang cukup baik.

Berdasarkan hasil penelitian gambaran luka antara kelompok kontrol negatif, kelompok perlakuan dan kontrol positif dapat dijelaskan sebagai berikut:



Gambar 5. 5 Kontrol Negatif Hari Ke 0 sampai Hari Ke 21

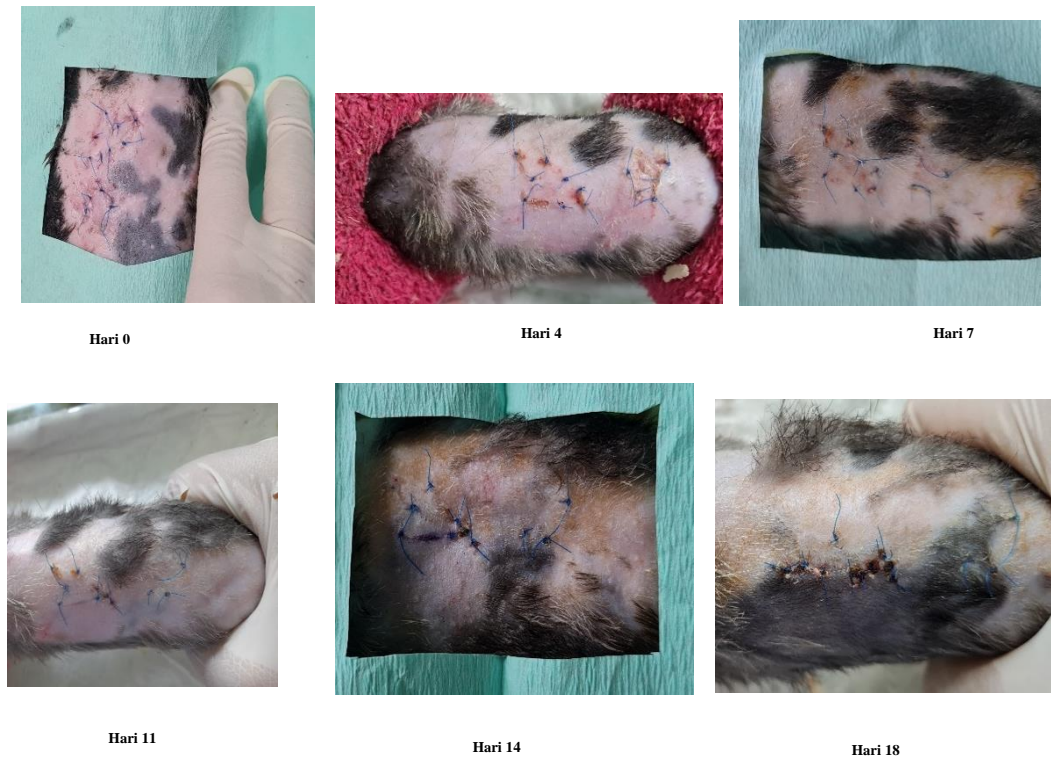
Pada kelompok kontrol negatif perkembangan skin graft dari hari kehari bila dibandingkan dengan kelompok perlakuan dan kontrol negatif menunjukkan hasil yang lebih buruk. Beberapa luka mengalami lisis sampai 50 % karena adanya infeksi pada luka. Luka skin graft yang intak sampai pada hari ke 21 menunjukkan gambaran yang lebih gelap dan scar yang kurang bagus .



Gambar 5. 6 Kelompok Perlakuan Hari Ke 0 sampai Hari Ke 21

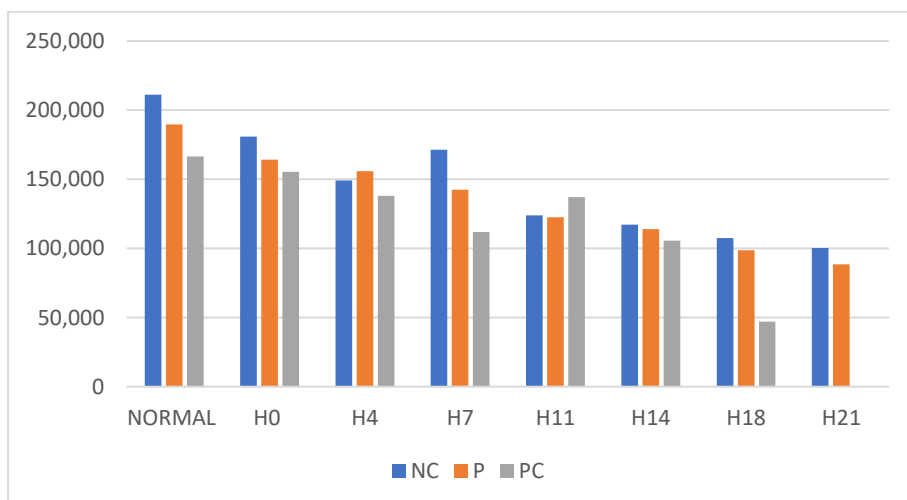
Pada gambar 5.6 terlihat bahwa kelompok kontrol memiliki proses penyembuhan luka skin graft lebih baik yang diikuti dengan penampakan warna yang lebih baik dari kelompok kontrol negatif. Apabila dibandingkan dengan kulit normal sekitar, warna skin graft relatif sama dan scar sangat samar. Pada kelompok ini skin graft semuanya take 100 %.

Pada kelompok kontrol positif proses penyembuhan luka skin graft juga lebih baik dibandingkan kontrol negatif dan menyerupai kelompok perlakuan. Warna kulit skin graft makin hari makin terang dan scar sangat samar. Secara penampakan klinis dapat dibuktikan bahwa penggunaan gel ekstrak kopi Robusta memberikan hasil yang mirip dan sama baiknya dengan gel ekstrak asam kojic 1%.



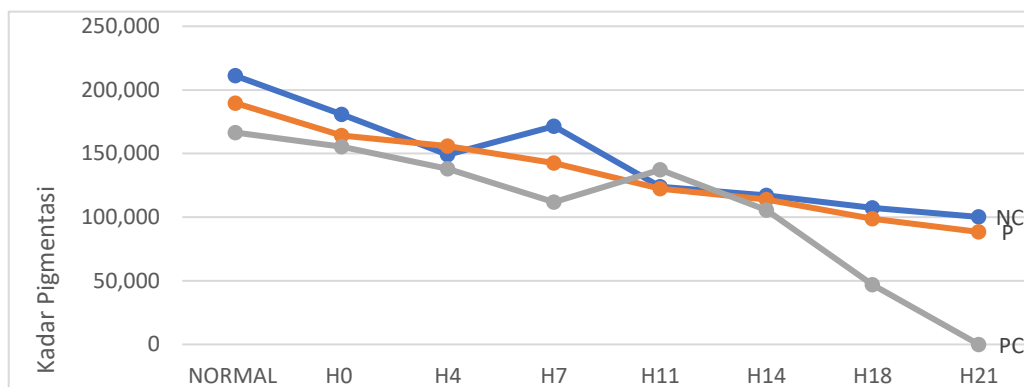
Gambar 5. 7 Kelompok kontrol positif

Untuk mengetahui perubahan warna skin graft secara detail maka dilakukan analisa menggunakan software imaje J. Software ini dapat menentukan perbedaan warna antara skin graft dengan warna sekitar serta perbedaan antara kelompok perlakuan. Gambar 5.8 berikut adalah hasil pemeriksaan image J pada setiap kelompok perlakuan.



Gambar 5. 8 Perbandingan daya hambat tirosinase berdasarkan intensitas warna antar kelompok perlakuan

Berdasarkan grafik batang 5.8 diatas menunjukkan bahwa terdapat penurunan intensitas warna pada seluruh kelompok. Adanya penurunan intensitas ini diidentikkan dengan adanya penurunan proses pigmentasi. Pada kelompok perlakuan dan kontrol positif penurunan mulai terlihat mulai hari ke tujuh. Penurunan yang paling banyak ditunjukkan pada tikus dengan pemberian asam kojic sebagai kontrol positif. Sedangkan kelompok perlakuan dengan menggunakan ekstrak kopi BP-42 sedikit lebih tinggi dari asam kojic tetapi masih lebih rendah dibandingkan dengan kelompok kontrol. Sehingga bisa dikatakan bahwa kelompok ekstrak kopi BP 42 memiliki penurunan yang mirip dengan kontrol positif.



Gambar 5. 9 grafik perbandingan daya hambat tirosinase berdasarkan analisa image J

Penilaian intensitas warna pada software imaje J sangat ditentukan oleh intensitas warna merah, hijau dan biru dari benda yang diamati. Penurunan intensitas warna sangat dipengaruhi oleh intensitas warna merah. Pada penelitian ini terdapat penurunan intensitas warna merah pada semua kelompok dengan penurunan paling banyak pada kelompok kontrol positif. Hal ini bila dikaitkan dengan proses penyembuhan luka skin graft maka pada hari ke -1 sampai dengan hari ke -5 terjadi proses neovaskularisasi. Ketika fase imbibisi mulai terlewati maka proses pembentukan pembuluh darah ini mulai menurun. Makin maturnya proses penyembuhan skin graft dan tumbuhnya

rambut halus pada permukaan skin graft menyebabkan warna merah makin menurun akibatnya warna biru menjadi lebih dominan.

Kekurangan dari pemeriksaan image J ini adalah intensitas warna yang ditangkap oleh sistem dipengaruhi oleh komponen-komponen yang ada dipermukaan skin graft sehingga sisa darah, sisa salep, crusta dan rambut halus yang tumbuh dapat menjadi faktor perancu dalam Analisa. Oleh karena itu proses pembersihan pada permukaan skin graft dan penyukuran rambut pada setiap perawatan luka menjadi sangat penting. Selain itu perlu pengamatan berulang agar didapatkan hasil yang konsisten.

5.2.1 Pembahasan

Kemiripan penampakan klinis dan lajuambat tirosinase antara kontrol positif dan ekstrak kopi Robusta BP-42 menunjukkan bahwa kopi BP-42 dapat dijadikan kandidat pengganti asam kojic. Kopi Robusta BP-42 memiliki efektifitas yang mirip dengan asam kojic dikarenakan memiliki berbagai macam senyawa aktif yang mendukung dalam penghambatan tyrosinase hydroquinone, *free fatty acid*, trigonelline, asam klorogenat dan kafeine.³⁻⁵

Asam klorogenat merupakan senyawa mayor yang memiliki peran yang penting dalam penurunan aktivitas tirosinase yang merupakan agen pigmentasi. Penelitian yang telah dilakukan di Jepang melaporkan bahwa konsumsi kopi dengan kadar asam klorogenat yang tinggi dapat menyamarkan *dark spot* karena sinar UV. Selain itu asam klorogenat memiliki peran sebagai anti-kanker dan antiinflamasi karena dapat berguna sebagai *free-radical scavenger* pada jaringan.^{8,9}

Kafeine merupakan senyawa aktif yang melimpah pada kopi. Kafeine memiliki manfaat antara lain sebagai agen anti inflamasi dan dapat merangsang pembentukan angiogenesis serta meningkatkan produksi matriks ekstraseluler pada

proses penyembuhan luka melalui peningkatan aktivitas adenosine-receptor. Kemampuan yang dimiliki oleh kafein ini telah terbukti membantu mempercepat penyembuhan luka skin graft full thickness pada tikus Sprague Dawley^{52,53}. Penelitian secara in siliko menunjukkan bahwa mekanisme penghambatan tirosinase oleh kafein terjadi sebagai akibat adanya pembentukan kompleks protein-ligan yang stabil yang disebut *enzyme-caffeine complex*. Adanya kompleks ini menyebabkan terjadinya hambatan terhadap reaksi enzimatik sehingga proses melanogenesis tidak dapat masuk ke tahap selanjutnya.⁵⁹

Free fatty acid juga merupakan zat aktif yang memiliki fungsi dalam menurunkan inflamasi. Free fatty acid memiliki dua turunan senyawa yaitu cafestol dan kahweol. Dua senyawa aktif inilah yang berfungsi secara sinergis dengan trigonelline dalam proses penurunan inflamasi.¹² Trigonelline merupakan senyawa yang terkenal untuk menurunkan inflamasi. Penelitian lain menyebutkan bahwa trigonelline dapat menurunkan kadar oxidative stress sehingga inflamasi yang terjadi dapat turun. Trigonelline merupakan senyawa yang tepat dalam penurunan inflamasi karena aktivitas dari hydroquinone. Adanya penurunan proses inflamasi ini akan mengurangi rangsangan mekanisme pembentukan pigmentasi pasca penyembuhan luka^{10,11}.

Hidroquinone adalah senyawa depigmentasi yang telah dijadikan sebagai *gold standar*. Secara klinis digunakan untuk mengobati area dyschromia, seperti melasma, chloasma, solar lentigines, bintik-bintik, dan hiperpigmentasi pasca inflamasi. Adanya kandungan hidroquinon pada ekstrak kopi Robusta BP 42 semakin memperkuat alasan bahwa ekstrak kopi robusta dapat dipakai sebagai bahan depigmentasi alami. Penelitian terbaru oleh Funakoshi-Tago, et (2022) melaporkan bahwa hidroquinon bersama pyrocatechol dan 4-ethylcatechol pada kopi berintegrasi dalam mekanisme penghambatan aktifitas inflamasi terhadap NF-kB melalui jalur aktivasi Nrf2. Hal ini

menunjukkan bahwa kandungan hidroquinon pada kopi relatif lebih aman dan tidak meningkatkan inflamasi pada kulit .

Oleh karena itu hasil penelitian ini menunjukkan bahwa ekstrak kopi Robusta BP 42 akan lebih baik penggunaannya dimasa yang akan datang bila dibandingkan dengan standard depigmentasi seperti asam kojic dan hidoquinon yang disebutkan memiliki efek samping berupa inflamasi yang ditandai dengan adanya kemerahan pada kulit bahkan menyebabkan kanker. Hal ini disebabkan ekstrak kopi tidak hanya memiliki kemampuan untuk menghambat proses pigmentasi tetapi ekstrak kopi juga memiliki kemampuan lain yang dimiliki oleh ekstrak kopi robusta seperti antiinflamasi, antioksidan, antibakteri yang mampu mengurangi efek yang tidak diinginkan.⁵⁹

BAB VI PENUTUP

6.1 Kesimpulan

1. Ekstrak kopi Robusta BP42 dari kabupaten Jember memiliki berbagai kandungan senyawa bioaktif dan senyawa yang diduga berhubungan dengan proses pigmentasi skin graft dengan kadar terbesar sampai terkecil adalah asam lemak, asam klorogenat, kafein, hidroquinon dan trigonellin
2. Ekstrak kopi Robusta BP42 memiliki efek antitirozinase meskipun lebih rendah dibandingkan dengan asam kojic dan memerlukan 10 kali lipat untuk menimbulkan efek yang sama dengan standard tersebut
3. Pemberian ekstrak kopi Robusta BP 42 pada luka skin graft memberikan hasil yang hampir sama dengan kontrol positif dan memiliki efek yang lebih baik bila dibandingkan dengan kontrol negatif pada penampakan secara klinis dan tingkat intensitas warna.

6.2 Saran

Berdasarkan penelitian ini maka saran yang diperlukan adalah

1. Perlu penelitian lebih lanjut menggunakan dosis yang lebih tinggi lagi
2. uji invitro aktifitas tyrosinase ekstrak kopi dalam berbagai bentuk sediaan untuk mendapatkan efek optimal dari ekstrak kopi robusta
3. Perlu adanya pemeriksaan menggunakan metode lain untuk memastikan tingkat intensitas warna dengan lebih memperhatikan faktor-faktor yang terkait dengan proses penyembuhan luka
4. Perlu penelitian terhadap jenis skin graft fullthicknes dan waktu pengamatan yang lebih Panjang.

DAFTAR PUSTAKA

1. Schlottmann F, Bucan V, Vogt PM, et al. A short history of skin grafting in burns: From the gold standard of autologous skin grafting to the possibilities of allogeneic skin grafting with immunomodulatory approaches. *Med* 2021; 57: 1–15.
2. Liodaki E, Bergmann PA, Kalousis K, et al. The central-pedicled intracorial skin-flap technique for reconstruction of the nipple-areola complex (NAC). *Breast* 2013; 22: 74–77.
3. Majid I. Grafting in vitiligo: How to get better results and how to avoid complications. *J Cutan Aesthet Surg* 2013; 6: 83.
4. Janowska A, Dini V, Panduri S, et al. Epidermal skin grafting in vitiligo: a pilot study. *Int Wound J* 2016; 13: 47–51.
5. Alsaif A, Karam M, Hayre A, et al. Full Thickness Skin Graft versus Split Thickness Skin Graft in Paediatric Patients with Hand Burns: Systematic Review and Meta-Analysis. *Burns* 2022; 1–11.
6. D’Mello SAN, Finlay GJ, Baguley BC, et al. Signaling pathways in melanogenesis. *Int J Mol Sci*; 17. Epub ahead of print 2016. DOI: 10.3390/ijms17071144.
7. Chang TS. Natural melanogenesis inhibitors acting through the down-regulation of tyrosinase activity. *Materials (Basel)* 2012; 5: 1661–1685.
8. Qian W, Liu W, Zhu D, et al. Natural skin-whitening compounds for the treatment of melanogenesis (Review). *Exp Ther Med* 2020; 20: 173–185.
9. Raposo G, Marks MS. Melanosomes — dark organelles enlighten endosomal membrane transport. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007; 8: 786–797.
10. Phasha V, Senabe J, Ndzotoyi P, et al. Review on the Use of Asam kojic—A Skin-Lightening Ingredient. *Cosmetics* 2022; 9: 1–11.

11. D. M, Karakay G. Asam kojic Derivatives. *Med Chem Drug Des*. Epub ahead of print 2012. DOI: 10.5772/31006.
12. Index mundi. Green Coffee Robusta Production by Country in 1000 60 KG BAGS - Country Rankings, <https://www.indexmundi.com/agriculture/?commodity=greencoffee&graph=robusta-production> (2017, accessed 5 November 2022).
13. Purwanto EH, Rubiyo, Towaha J. Karakteristik Mutu dan Citarasa Kopi Robusta Klon BP 42, BP 358 dan BP 308 Asal Bali dan Lampung. *Sirinov, Balai Penelit Tanam Ind dan Penyegar* 2015; 3: 67–74.
14. Fukushima Y, Takahashi Y, Kishimoto Y, et al. Consumption of polyphenols in coffee and green tea alleviates skin photoaging in healthy Japanese women. *Clin Cosmet Investig Dermatol* 2020; 13: 165–172.
15. Ribeiro HM, Allegro M, Marto J, et al. Converting Spent Coffee Grounds into Bioactive Extracts with Potential Skin Antiaging and Lightening Effects. *ACS Sustain Chem Eng* 2018; 6: 6289–6295.
16. Aulifa DL, Caroline M, Tristiyanti D, et al. Formulation of the serum gel containing green coffee bean (*Coffea robusta* L) extract as an antioxidant and tyrosinase enzyme inhibitor. *Rasayan J Chem* 2020; 13: 2346–2351.
17. D’Mello SAN, Finlay GJ, Baguley BC, et al. Signaling pathways in melanogenesis. *Int J Mol Sci* 2016; 17: 1–18.
18. Videira IF dos S, Moura DFL, Magina S. Mechanisms regulating melanogenesis. *An Bras Dermatol* 2013; 88: 76–83.
19. Cho K, Ryu CS, Jeong S, et al. Potential adverse effect of tyrosinase inhibitors on teleosts: A review. *Comp Biochem Physiol Part - C Toxicol Pharmacol* 2020; 228: 108655.
20. Pillaiyar T, Namasivayam V, Manickam M, et al. Inhibitors of Melanogenesis: An

- Updated Review. *J Med Chem* 2018; 61: 7395–7418.
21. Mamoto N, Kalangi S, Karundeng R. Peran Melanokortin Pada Melanosit. *J Biomedik* 2013; 1: 1–11.
 22. Yang Y, Sun X, Ni H, et al. Identification and Characterization of the Tyrosinase Inhibitory Activity of Kafeine from Camellia Pollen. *J Agric Food Chem* 2019; 67: 12741–12751.
 23. Gillbro JM, Olsson MJ. The melanogenesis and mechanisms of skin-lightening agents - Existing and new approaches. *Int J Cosmet Sci* 2011; 33: 210–221.
 24. Jungbluth AA, Iversen K, Coplan K, et al. T311 - An anti-tyrosinase monoclonal antibody for the detection of melanocytic lesions in paraffin embedded tissues. *Pathol Res Pract* 2000; 196: 235–242.
 25. Yamate Y, Hiramoto K, Sato EF. The Preventive Effect of Coffee Compounds on Dermatitis and Epidermal Pigmentation after Ultraviolet Irradiation in Mice. *Skin Pharmacol Physiol* 2017; 30: 24–35.
 26. Xue CY, Li L, Guo LL, et al. The involvement of alpha-melanocyte-stimulating hormone in the hyperpigmentation of human skin autografts. *Burns* 2010; 36: 284–290.
 27. Chuenkongkaew T. Modification of split-thickness skin graft: Cosmetic donor site and better recipient site. *Ann Plast Surg* 2003; 50: 212–214.
 28. Jacobsohn DA, Vogelsang GB. Acute graft versus host disease. *Orphanet J Rare Dis*; 2. Epub ahead of print 2007. DOI: 10.1186/1750-1172-2-35.
 29. Ogawa R, Hyakusoku H, Ono S. Useful tips for successful skin grafting. *J Nippon Med Sch* 2007; 74: 386–392.
 30. Burnett LN, Carr E, Tapp D, et al. Patient experiences living with split thickness skin grafts. *Burns* 2014; 40: 1097–1105.

31. Andreassi A, Bilenchi R, Biagioli M, et al. Classification and pathophysiology of skin grafts. *Clin Dermatol* 2005; 23: 332–337.
32. Bogdanov SB, Gilevich I V., Melkonyan KI, et al. Total full-thickness skin grafting for treating patients with extensive facial burn injury: A 10-year experience. *Burns* 2021; 47: 1389–1398.
33. Seymour FK, Giele HP. Tie-overs under pressure. *Br J Plast Surg* 2003; 56: 494–497.
34. Simman R. Wound Closure and the Reconstructive Ladder in Plastic Surgery. *J Am Col Certif Wound Spec* 2009; 1: 6–11.
35. Carvalho MTB, Araújo-Filho HG, Barreto AS, et al. Wound healing properties of flavonoids: A systematic review highlighting the mechanisms of action. *Phytomedicine*; 90. Epub ahead of print 1 September 2021. DOI: 10.1016/j.phymed.2021.153636.
36. Choi J-S, Lee J-H, Kim ; S-M, et al. *Hydrogel-impregnated dressings for graft xation: a case series sorbact, skin graft, sorbact gel, petrolatum, paraffin, infection.*
37. Ebanks JP, Wickett RR, Boissy RE. Mechanisms regulating skin pigmentation: The rise and fall of complexion coloration. *Int J Mol Sci* 2009; 10: 4066–4087.
38. Wang LZ, Ding JP, Yang MY, et al. Treatment of facial post-burn hyperpigmentation using micro-plasma radiofrequency technology. *Lasers Med Sci* 2014; 30: 241–245.
39. Slominski A, Zmijewski MA, Pawelek J. L-tyrosine and L-dihydroxyphenylalanine as hormone-like regulators of melanocyte functions. *Pigment Cell Melanoma Res* 2012; 25: 14–27.
40. Matsumoto K, Robb E, Warden G, et al. Hyperpigmentation of human skin grafted

- on to athymic nude mice: Immunohistochemical study. *Br J Dermatol* 1996; 135: 412–418.
41. Kang XL, Shen H. Pigmentation of skin graft is improved by cryopreservation of human skin with trehalose. *J Oral Maxillofac Surg* 2012; 70: 1464–1472.
 42. Kath J, Byrareddy VM, Craparo A, et al. Not so robust: Robusta coffee production is highly sensitive to temperature. *Glob Chang Biol* 2020; 26: 3677–3688.
 43. Ky CL, Louarn J, Dussert S, et al. Kafeine, trigonelline, chlorogenic acids and sucrose diversity in wild *Coffea arabica* L. and *C. canephora* P. accessions. *Food Chem* 2001; 75: 223–230.
 44. Prabowo WH, Awal Prasetyo, Neni Susilaningsih. The Effect of Multilevel Doses of Kafeine on Tissue Macrophage and Blood Lymphocyte Count in Autologous Full Thickness Skin Graft Healing in Sprague Dawley Rats. *Biosci Med J Biomed Transl Res*; 6. Epub ahead of print 9 March 2022. DOI: 10.37275/bsm.v6i5.498.
 45. Fatimatuzzahro N, Ermawati T, Prasetya RC, et al. <p>Efek pemberian gel ekstrak biji kopi robusta (*Coffea canephora*) terhadap jumlah osteoblas dan osteoklas pada tulang alveolar tikus periodontitis</p><p>The effect of robusta coffee bean (*Coffea canephora*) extract gel on the number of osteoblasts and ost. *Padjadjaran J Dent Res Students* 2020; 4: 128.
 46. Rahmanian-Schwarz A, Knoeller T, Held M, et al. A new, rapid, standardized method for harvesting split skin grafts in rodents. *Plast Reconstr Surg* 2011; 127: 1494–1497.
 47. Atlabachew M, Abebe A, Alemneh Wubieneh T, et al. Rapid and simultaneous determination of trigonelline, kafeine, and chlorogenic acid in green coffee bean extract. *Food Sci Nutr* 2021; 9: 5028–5035.

48. Jeszka-Skowron M, Sentkowska A, Pyrzyńska K, et al. Chlorogenic acids, kafeine content and antioxidant properties of green coffee extracts: influence of green coffee bean preparation. *Eur Food Res Technol* 2016; 242: 1403–1409.
49. Saini RK, Prasad P, Shang X, et al. Advances in lipid extraction methods—a review. *Int J Mol Sci* 2021; 22: 1–19.
50. Putri SP, Irifune T, Yusianto, et al. GC/MS based metabolite profiling of Indonesian specialty coffee from different species and geographical origin. *Metabolomics* 2019; 15: 1–11.
51. Yusianto, Nugroho D. Physical and Flavor Profiles of Arabica Coffee as Affected by Cherry Storage Before Pulping. *Pelita Perkeb (a Coffee Cocoa Res Journal)* 2014; 30: 137–158.
52. Sharma H. A Detail Chemistry of Coffee and Its Analysis. *Coffee - Prod Res* 2020; 3–5.
53. Speer K, Kölling-Speer I. The lipid fraction of the coffee bean. *Brazilian J Plant Physiol* 2006; 18: 201–216.
54. Funakoshi-Tago M, Matsutaka M, Hokimoto S, et al. Coffee ingredients, hydroquinone, pyrocatechol, and 4-ethylcatechol exhibit anti-inflammatory activity through inhibiting NF- κ B and activating Nrf2. *J Funct Foods* 2022; 90: 104980.
55. Hasan AEZ, Utami NF, . M. EXTRACTION OF ROBUSTA COFFEE BEANS (Coffea canephora) FROM WONOSOBO BY ULTRASONIC WAVES AND ANTICANCER TESTS. *FITOFARMAKA J Ilm Farm* 2022; 12: 89–99.
56. Ribeiro AS, Estanqueiro M, Oliveira MB, et al. Main benefits and applicability of plant extracts in skin care products. *Cosmetics* 2015; 2: 48–65.
57. Rais J. Phytochemicals in the treatment of ovarian cancer nbsp. *Front Biosci* 2016;

- 9: 67–75.
58. Kiattisin K, Nantarat T, Leelapornpisid P. Evaluation of antioxidant and anti-tyrosinase activities as well as stability of green and roasted coffee bean extracts from *Coffea arabica* and *Coffea canephora* grown in Thailand. *J Pharmacogn Phyther* 2016; 8: 182–192.
59. Chang TS. An updated review of tyrosinase inhibitors. *Int J Mol Sci* 2009; 10: 2440–2475.