

Efek pemberian gel ekstrak biji kopi robusta (*Coffea canephora*) terhadap jumlah osteoblas dan osteoklas pada tulang alveolar tikus periodontitis

Nadie Fatimatuzzahro¹, Tantin Ermawati¹, Rendra Chriestedy Prasetya¹,
Pintan Qorina Destianingrum^{1*}

¹Departemen Biomedik, Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember, Indonesia

*Korespondensi: e-mail: pintan93@gmail.com

Submisi: 03 Juni 2020; Penerimaan: 31 Agustus 2020; Publikasi Online: 31 Oktober 2020

DOI: [10.24198/pjdrs.v4i2.28383](https://doi.org/10.24198/pjdrs.v4i2.28383)

ABSTRAK

Pendahuluan: Periodontitis adalah peradangan jaringan pendukung gigi yang disebabkan oleh mikroorganisme, salah satunya *Porphyromonas gingivalis*, yang dapat menginduksi makrofag dan limfosit serta menstimulasi osteoblas untuk meningkatkan *receptor activator of nuclear factor κ B-ligand* (RANKL) dan menurunkan osteoprotegerin (OPG). Kondisi inflamasi yang berlanjut mengakibatkan OPG sedikit mengikat RANKL, sehingga RANKL berikatan dengan *receptor activator of nuclear factor κ B* (RANK) pada prekursor osteoklas. Hal ini akan mengaktifkan osteoklas dan menyebabkan kerusakan tulang. Osteoblas dan osteoklas berperan dalam keseimbangan resorpsi dan aposisi tulang. Biji kopi robusta mengandung senyawa aktif polifenol, alkaloid, dan saponin, yang bersifat antiinflamasi. Penelitian bertujuan untuk menganalisis efek gel ekstrak biji kopi robusta (*C. canephora*) terhadap jumlah osteoblas dan osteoklas pada tulang alveolar tikus periodontitis. **Metode:** Jenis penelitian eksperimental laboratoris, menggunakan teknik *random sampling* untuk penelitian *in-vivo*, diperoleh minimal sampel sebanyak 4 ekor tikus tiap kelompok; kelompok normal (KN); kelompok kontrol negatif gel plasebo K(-)7 dan K(-)14; kelompok kontrol positif gel aloclair K(+7) dan K(+14); dan kelompok gel ekstrak biji kopi 50% (KP7 dan KP14). Hewan coba didekapitasi pada hari ke-7 dan 14 setelah pemberian terapi gel, kemudian dilakukan pemrosesan jaringan dan pewarnaan HE. Penghitungan osteoblas dan osteoklas pada area sekitar tulang alveolar bukal M1 kiri bawah. **Hasil:** Terdapat perbedaan yang signifikan ($p=0,001$) antara rerata jumlah osteoblas kelompok gel ekstrak kopi ($33,83\pm 1,37$) dibanding kontrol positif ($23,24\pm 2,31$) dan kontrol negatif ($18,91\pm 2,07$). Rerata jumlah osteoklas berbeda signifikan ($p=0,001$) pada kelompok gel ekstrak kopi ($0,66\pm 0,54$) dibanding kontrol positif ($3,08\pm 1,10$) dan kontrol negatif ($4,00\pm 2,07$) ($p=0,010$). **Simpulan:** Pemberian gel ekstrak biji kopi robusta (*C. canephora*) dapat meningkatkan jumlah osteoblas dan menurunkan osteoklas pada tulang alveolar tikus periodontitis.

Kata kunci: Gel ekstrak biji kopi robusta, osteoblas, osteoklas, periodontitis.

The effect of robusta coffee bean (Coffea canephora) extract gel on the number of osteoblasts and osteoclasts in the alveolar bone of periodontitis rats

ABSTRACT

Introduction: Periodontitis is an inflammatory disease affecting the teeth supporting tissues caused by specific microorganisms; one of them is *Porphyromonas gingivalis*, which can induce the macrophages and lymphocytes, then stimulate the osteoblasts to increase the receptor activator of nuclear factor κ B-ligand (RANKL) and decrease osteoprotegerin (OPG). Continued inflammatory conditions cause OPG to bind slightly to the RANKL; thus the RANKL will be able to binds to the receptor activator of nuclear factor κ B (RANK) in osteoclast precursors, which will activate the osteoclasts and cause bone damage. Osteoblasts and osteoclasts play a vital role in the balance of bone resorption and apposition. Robusta coffee beans contain active compounds such as polyphenols, alkaloids, and saponins, which act as anti-inflammatory agents. This research was aimed to analyse the effect of robusta coffee bean (*C. canephora*) extract gel on the number of osteoblasts and osteoclasts in the alveolar bone of periodontitis rats. **Methods:** Experimental laboratory research with simple random sampling technique for *in-vivo* study obtained the minimal sample number of 4 rats in each group; normal group (KN); negative control group placebo gel K(-)7 and K(-)14; positive control group of aloclair gel K(+7) and K(+14); and robusta coffee bean 50% extract gel group (KP7 and KP14). The rats were decapitated in the 7th and 14th days after treatment, and then the tissue processing and hematoxylin-eosin staining was carried out. Osteoblasts and osteoclasts were counted in the area around the buccal alveolar bone of the lower-left M1. **Results:** The results showed a significant difference ($p = 0.001$) between the mean number of osteoblasts in the coffee extract gel group (33.83 ± 1.37) compared to the positive control group (23.24 ± 2.31) and the negative control group (18.91 ± 2.07). The mean number of osteoclasts was also had a significant difference ($p = 0.001$) in the coffee extract gel group (0.66 ± 0.54) compared to the positive control group (3.08 ± 1.10) and ($p = 0.010$) with the negative control group (4.00 ± 2.07). **Conclusion:** Robusta coffee bean (*C. canephora*) extract gel can increase the number of osteoblasts and decrease the number of osteoclasts in the alveolar bone of periodontitis rats.

Keywords: Robusta coffee bean extract gel, osteoblasts, osteoclasts, periodontitis.

PENDAHULUAN

Penyakit periodontal adalah penyakit dengan nilai prevalensi tinggi di dunia. Penyakit periodontal yang sering terjadi adalah gingivitis dan periodontitis.¹ Data Riset Kesehatan Dasar (RISKESDAS) 2018 menunjukkan persentase kasus periodontitis di Indonesia sebesar 74,1%.² Periodontitis adalah penyakit peradangan kronis yang disebabkan oleh interaksi antara biofilm subgingiva dan respon imun *host*, yang mengarah pada kerusakan jaringan pendukung gigi.³ Peradangan tersebut disebabkan oleh mikroorganisme, salah satunya adalah *Porphyromonas gingivalis*.⁴

Porphyromonas gingivalis mengeluarkan faktor virulen dan protease ekstraseluler seperti lipopolisakarida, fimbriae, *gingipain* yang mengakibatkan kerusakan jaringan periodontal sehingga menyebabkan perubahan kekebalan bawaan dan respon peradangan.⁵ *Porphyromonas gingivalis* dapat menginduksi makrofag dan fibroblas untuk menghasilkan sitokin proinflamasi seperti interleukin 1- β (IL-1 β), interleukin-6 (IL-6), *tumor necrosis factor- α* (TNF- α) dan prostaglandin E2 (PGE-2) yang dapat menyebabkan resorpsi tulang alveolar dengan menurunkan jumlah osteoblas.⁶

TNF- α memainkan peran utama dalam reaksi inflamasi, resorpsi tulang alveolar, dan hilangnya perlekatan jaringan ikat.⁷ Prostaglandin dan sitokin proinflamasi juga dapat menghasilkan *reactive oxygen species* (ROS) yang menyebabkan resorpsi tulang alveolar dengan menstimulasi pembentukan osteoklas dan peningkatan aktivitasnya.⁸

Osteoklas merupakan sel motil bercabang, sangat besar dan berinti banyak.⁹ Pembentukan dan aktivasi osteoklas salah satunya diperankan oleh *receptor activator of nuclear factor κ B-ligand* (RANKL) yang diekspresikan oleh osteoblas.¹⁰ Osteoblas adalah sel pembentuk tulang yang berasal dari *mesenchymal stem cell*.⁹ Sitokin proinflamasi yang terbentuk pada proses inflamasi dapat menstimulasi osteoblas untuk meningkatkan produksi RANKL dan menurunkan produksi *osteoprotegerin* (OPG).⁶ OPG adalah protein yang dihasilkan oleh osteoblas yang akan berikatan dengan RANKL untuk menghambat pembentukan dan aktivasi osteoklas.¹¹ Kondisi inflamasi yang terus berlanjut mengakibatkan OPG akan sedikit mengikat RANKL sehingga RANKL mudah berikatan dengan RANK pada prekursor osteoklas dan menyebabkan kerusakan tulang.¹² Kerusakan tulang dan jaringan

akan terus berlangsung selama proses inflamasi, sehingga untuk mencegah kerusakan yang lebih parah diperlukan suatu obat anti inflamasi.

Salah satu obat anti inflamasi yang sering digunakan dalam bidang kedokteran gigi yaitu gel aloclair. Komposisi dari gel aloclair meliputi ekstrak lidah buaya (*Aloe vera*), asam hyaluronat, *glycyrrhetic acid*, dan *polyvinyl-pyrrolidone*.¹³ Asam hyaluronat bekerja menghambat sintesis prostaglandin, metaloproteinase, dan molekul bioaktif lainnya.¹⁴ Efek samping dari asam hyaluronat yaitu menyebabkan iritasi lokal berupa kemerahan, bengkak dan gatal.¹⁵ Untuk meminimalkan efek samping tersebut, gel ekstrak biji kopi robusta diduga dapat digunakan sebagai salah satu alternatif bahan alami, karena memiliki sifat anti inflamasi.¹⁶

Kopi robusta (*C. canephora*) merupakan jenis kopi yang banyak dikembangkan di Indonesia. Biji kopi robusta memiliki kandungan senyawa aktif lebih banyak dibandingkan kopi arabika.¹⁷ Penelitian sebelumnya menunjukkan biji kopi robusta mengandung senyawa aktif yaitu polifenol yang memiliki efek antiinflamasi, alkaloid yang memiliki efek antioksidan serta saponin yang dapat merangsang proliferasi sel epitel.¹⁸ Penelitian Ermawati dkk.¹⁹ membuktikan potensi ekstrak polifenol biji kopi robusta efektif menurunkan derajat inflamasi yang ditandai dengan penurunan ekspresi TNF- α . Penurunan ekspresi TNF- α diduga dapat menurunkan derajat inflamasi, sehingga diharapkan tidak terjadi kerusakan tulang lebih lanjut. Penelitian ini bertujuan untuk menganalisis efek pemberian gel ekstrak biji kopi robusta (*C. canephora*) terhadap jumlah osteoblas dan osteoklas pada tulang alveolar tikus periodontitis.

METODE

Jenis penelitian adalah eksperimental laboratoris, dan telah disetujui oleh Komisi Etik Penelitian Kesehatan Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember No. 627/ UN25.8/ KEPK/DL/ 2019. Pembuatan ekstrak biji kopi robusta (*C. canephora*) dilakukan dengan menghaluskan biji kopi robusta yang sudah dikeringkan, kemudian menimbang bubuk simplisia sebanyak 375 gram dan dilakukan maserasi dalam 1500 ml larutan etanol 96% selama 72 jam sehingga diperoleh ekstrak kental 100% sebanyak 28 gram. Sebanyak 5 gram ekstrak biji kopi robusta dicampurkan dengan 5 gram basis gel

sodium carboxymethyl cellulose (CMC-Na) secara homogen sehingga didapatkan gel ekstrak biji kopi robusta konsentrasi 50% sebanyak 10 gram. Penelitian ini menggunakan hewan coba tikus wistar jantan usia 2-3 bulan dengan berat badan 180-200 gram sebanyak 28 ekor. Tikus diberi pakan standar turbo dan minum air mineral. Tikus diadaptasi selama satu minggu kemudian dibagi secara acak dalam 7 kelompok: kelompok kontrol/ normal (KN), kelompok kontrol negatif gel plasebo K(-)7 dan K(-)14, kelompok kontrol positif gel aloclair K(+7) dan K(+14), kelompok gel ekstrak biji kopi 50% (KP7 dan KP14).

Tikus diinduksi *Porphyromonas gingivalis* dengan konsentrasi $1,5 \times 10^8$ CFU/ml pada sulkus gingiva bukal M1 kiri bawah, setiap 3 hari sekali selama 14 hari menggunakan *tuberculin syringe* ukuran jarum 30 gauge. Isolat bakteri *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 didapatkan dari Laboratorium Bioscience Rumah Sakit Gigi dan Mulut Universitas Jember.

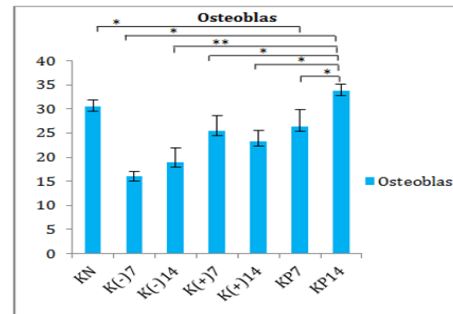
Sebanyak 4 ekor tikus wistar dalam setiap kelompok perlakuan dilakukan dekapitasi pada hari ke-7 dan 14 setelah pemberian topikal gel plasebo, gel aloclair dan gel ekstrak biji kopi robusta 50% pada sulkus gingiva M1 kiri bawah satu kali sehari sebanyak 0,05 ml. Periode tersebut digunakan untuk melihat jumlah osteoblas dan osteoklas tulang alveolar berdasarkan kondisi TNF- α sebagai mediator inflamasi, mengacu pada penelitian sebelumnya bahwa terjadi peningkatan ekspresi TNF- α pada tikus periodontitis hari ke-7, tetapi pada hari ke-14 ekspresi TNF- α mengalami penurunan yang menandakan terjadi penurunan proses inflamasi.¹⁶

Tahap berikutnya dilakukan pengambilan rahang bawah kiri tikus dan dilakukan pemrosesan jaringan serta pewarnaan hematoksilin eosin. Penghitungan jumlah osteoblas dan osteoklas dilakukan dalam 5 lapang pandang berbeda, mulai dari apikal sampai korona tulang alveolar bagian bukal M1 rahang bawah kiri menggunakan mikroskop dengan perbesaran 400x. Data hasil pengamatan dianalisis menggunakan *two-way ANOVA* dan *Least Significance Different (LSD)* dengan tingkat kepercayaan 95% ($p < 0,05$).

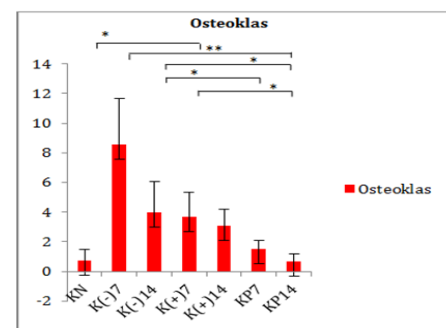
HASIL

Rerata jumlah osteoblas kelompok KP14 yang tertinggi, diikuti kelompok KN, K(+7), dan K(-)7

Gambar 1. Rerata jumlah osteoklas kelompok K(-)7 yang paling tinggi dari semua kelompok, sedangkan yang paling rendah pada kelompok KP14 Gambar 2.

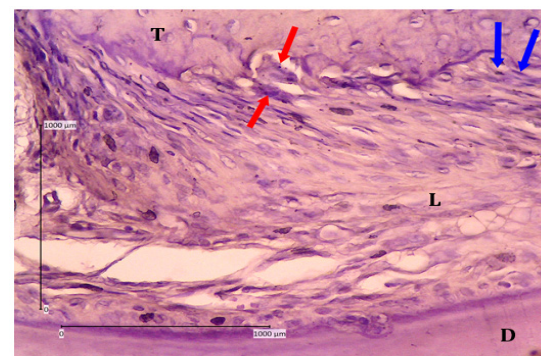


Gambar 1. Rerata dan simpangan baku jumlah osteoblas pada semua kelompok (* $p < 0,001$, ** $p < 0,05$)



Gambar 2. Rerata dan simpangan baku jumlah osteoklas pada semua kelompok (* $p < 0,001$, ** $p < 0,05$)

Gambaran histologi osteoblas tampak sel berbentuk pipih atau kubus dengan jumlah inti sel satu berwarna biru/ungu gelap, sitoplasma tampak basofilik dan terletak pada permukaan jaringan tulang alveolar dan osteoklas tampak seperti sel raksasa yang berinti banyak. Inti sel berwarna biru atau ungu gelap, sitoplasma berwarna kemerahan dan terletak pada cekungan dangkal (*lakuna howship*) permukaan tulang alveolar Gambar 3



Gambar 3. Gambaran histologi osteoklas dan osteoblas pada tulang alveolar dengan perbesaran 400x. T: tulang alveolar; L: ligamen periodontal; D: dentin; Anak panah merah: osteoklas; Anak panah biru: osteoblas

Hasil *two-way* ANOVA menunjukkan terdapat perbedaan bermakna jumlah osteoblas dan osteoklas antar kelompok ($p < 0,05$). Hasil Uji LSD osteoblas menunjukkan terdapat perbedaan yang bermakna ($p = 0,001$) antara rerata jumlah osteoblas kelompok KP14 dibanding KP7, K(+)¹⁴, K(+)⁷, K(-)⁷, dan K(-)¹⁴. Uji LSD pada osteoklas didapatkan bahwa terdapat perbedaan bermakna ($p = 0,001$) pada kelompok KP14 dibanding K(-)⁷ dan berbeda bermakna ($p = 0,010$) dibanding K(+)⁷ dan K(-)¹⁴.

PEMBAHASAN

Hasil penelitian menunjukkan bahwa rerata jumlah osteoklas dan osteoblas kelompok kontrol negatif hari ke-7 berbeda bermakna dengan semua kelompok. Jumlah osteoblas kelompok kontrol negatif hari ke-7 merupakan yang paling rendah, sedangkan jumlah osteoklas pada kelompok ini yang paling tinggi, didukung penelitian sebelumnya bahwa induksi lipopolisakarida (LPS) *P. gingivalis* pada tikus wistar dapat meningkatkan osteoklas dan menurunkan osteoblas.²⁰ Peningkatan jumlah osteoklas ini membuktikan bahwa induksi bakteri *Porphyromonas gingivalis* dapat menyebabkan peradangan.

Porphyromonas gingivalis menstimulasi sistem imun yang berusaha menjaga *host* dari infeksi dengan mengaktifkan sel imun seperti neutrofil, makrofag, dan limfosit untuk memerangi bakteri. polimorfonuklear (PMN) dan monosit distimulasi untuk memproduksi *matrix metalloproteinase* (MMP), PGE-2 dan sitokin proinflamasi seperti IL-1, IL-6 dan TNF- α .⁴ Sitokin akan menstimulasi fibroblas dan limfosit untuk memproduksi RANKL, kemudian RANKL akan berikatan dengan reseptor pada pre-osteoklas untuk selanjutnya menjadi osteoklas dewasa (osteoklastogenesis).²¹ Selain itu, sitokin yang terbentuk selama proses inflamasi juga berperan dalam peningkatan apoptosis osteoblas dan prekusornya sehingga produksi osteoblas akan menurun.⁴

PGE-2 akan menginduksi osteoblas memproduksi RANKL dan menurunkan produksi OPG.⁵ Penurunan OPG mengakibatkan RANKL berikatan dengan RANK yang menyebabkan pembentukan osteoklas.¹⁰ Keadaan tersebut menyebabkan jumlah osteoblas menurun.¹¹ *Arg-gingipain* (Rgp) dan *Lys-gingipain* (Kgp) yang berada pada dinding sel bakteri juga berperan pada

proses ini. Kgp dapat meningkatkan pembentukan osteoklas melalui degradasi OPG yang merupakan faktor penghambat pembentukan osteoklas²², sedangkan Rgp dapat menstimulasi MMP yang dapat menyebabkan degradasi kolagen.²³ Rerata jumlah osteoklas pada kelompok perlakuan hari ke-7 dan ke-14 berbeda bermakna dengan kelompok kontrol negatif. Penurunan osteoklas terjadi pada kelompok perlakuan hari ke-7, dan semakin menurun pada hari ke-14. Hal ini menunjukkan bahwa pemberian gel ekstrak biji kopi robusta mampu menurunkan proses inflamasi yang berlangsung.

Gel ekstrak biji kopi robusta (*C. canephora*) mengandung senyawa aktif yaitu polifenol, alkaloid dan saponin yang bersifat anti inflamasi.¹⁸ Peran asam klorogenat sebagai komponen fenol utama dari gel ekstrak biji kopi robusta memodifikasi respon *host* dengan menghambat PMN dan monosit untuk memproduksi MMP, PGE2 dan sitokin pro inflamasi seperti IL-1, IL-6 dan TNF- α .²⁴ Hal ini didukung oleh penelitian Ermawati dkk.¹⁶ yang membuktikan bahwa pemberian ekstrak polifenol biji kopi robusta efektif menurunkan derajat inflamasi yang ditandai dengan penurunan ekspresi TNF- α . Penurunan produksi sitokin proinflamasi menyebabkan penghambatan pembentukan osteoklas.²⁵

Rerata osteoklas pada kelompok kontrol positif hari ke-7 dan ke-14 berbeda bermakna dengan kelompok kontrol negatif hari ke-7. Hal ini menunjukkan bahwa pemberian gel *alocclair* pada kontrol positif mampu menurunkan proses inflamasi yang berlangsung. Begitu pula dengan dengan rerata osteoblas kelompok kontrol positif berbeda bermakna dengan kelompok kontrol negatif hari ke-7 dan ke-14. *Aloe vera* yang menjadi kandungan utama dari gel *alocclair* memiliki senyawa polifenol yang juga ditemukan pada tanaman kopi, yang diduga mempunyai cara kerja yang sama sebagai anti inflamasi.¹³ Sifat anti inflamasi dari *alocclair* diduga turut berperan dalam menurunkan osteoklas.

Jumlah osteoblas kelompok perlakuan gel ekstrak biji kopi robusta hari ke-7 menunjukkan hasil berbeda bermakna dengan kelompok kontrol negatif hari ke-7 dan ke-14, yang artinya pada hari ke-7 gel ekstrak biji kopi robusta sudah mampu menurunkan reaksi inflamasi. Jumlah osteoblas pada kelompok perlakuan hari ke-14 ditemukan paling banyak dari semua kelompok. Hasil ini tidak berbeda bermakna dengan kelompok kontrol (KN) yang berarti jumlah osteoblas pada kelompok

perlakuan hari ke-14 yang sudah mendekati normal. Hal ini didukung oleh penelitian Herniyati dkk.¹¹ yang menyatakan bahwa pemberian ekstrak biji kopi robusta dapat meningkatkan jumlah osteoblas dan angiogenesis (pembentukan pembuluh darah) pada area pergerakan gigi yang dirawat ortodonti. Hal tersebut dapat terjadi karena efek antioksidan dari asam klorogenat dan kafein yang terkandung dalam ekstrak biji kopi robusta berperan meningkatkan aktivitas dan pembentukan osteoblas.

Kafein pada kopi juga dapat meningkatkan diferensiasi osteoblas dengan mengikat reseptor adenosin dan memodulasi beberapa reseptor lain termasuk reseptor glukokortikoid, insulin, estrogen, vitamin D dan reseptor androgenik yang semuanya diekspresikan dalam osteoblas.²⁶ Proses fagositosis oleh PMN yang berlebihan pada tahap awal terjadinya periodontitis dapat menyebabkan terbentuknya radikal bebas (ROS).²⁷ ROS yang berlebihan akan menyebabkan destruksi jaringan tulang alveolar.⁹ Gel ekstrak biji kopi robusta memiliki kandungan senyawa aktif berupa asam klorogenat dan flavonoid yang berperan sebagai agen antioksidan untuk menekan radikal bebas (ROS).¹⁸

Flavonoid sebagai antioksidan menangkap radikal bebas, menyumbangkan ion hidrogen, mengikat ion-ion logam, dan *anti lipid peroxidative*.²⁸ Asam klorogenat berperan sebagai agen yang menekan radikal bebas dengan mempengaruhi fungsi neutrofil saat fagositosis yang dapat menghasilkan ROS dan juga sebagai agen penghambat reaksi rantai peroksidasi lipid.²⁹ Hal ini didukung oleh penelitian Pergolizzi *et al.*³⁰ yang menunjukkan bahwa pemberian ekstrak metanol biji hijau kopi robusta pada peradangan kulit tikus dapat meningkatkan pengikatan radikal bebas yang berkontribusi pada aktivitas antiinflamasi.

SIMPULAN

Pemberian gel ekstrak biji kopi robusta (*C. canephora*) dapat meningkatkan jumlah osteoblas dan menurunkan osteoklas pada tulang alveolar tikus periodontitis.

DAFTAR PUSTAKA

1. Saputri D. Gambaran radiografi pada penyakit periodontal. J Siah Kuala Dent Soc. 2018; 3(1): 16-21.

2. Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan (Balitbangkes). RISKESDAS 2017-2018. Jakarta: Kementerian Kesehatan Republik Indonesia; 2018. h. 207.
3. Baek KJ, Ji S, Kim YC, Choi Y. Association of the invasion ability *Porphyromonas gingivalis* with the severity of periodontitis. *Virulence*. 2015; 6(3): 274-81. DOI: [10.1080/21505594.2014.1000764](https://doi.org/10.1080/21505594.2014.1000764)
4. Newman MG, Takei HH, Klokkevold PR, Carranza FA. *Carranza's Clinical Periodontology*. 12th ed. Philadelphia: Saunders-Elsevier; 2015. p. 316-317.
5. Rafiei M, Kiani F, Sayehmiri F, Sayehmiri K, Sheikhi A, Azodi MZ. Study of *Porphyromonas gingivalis* in periodontal diseases: A systematic review and meta-analysis. *Med J Islam Repub Iran*. 2017; 31: 62. DOI: [10.18869/mjiri.31.62](https://doi.org/10.18869/mjiri.31.62)
6. Mysak J, Podzimek S, Sommerova P, Lyuya-Mi Y, Bartova J, Janatova T, et al. *Porphyromonas gingivalis*: Major periodontopathic pathogen overview. *J Immunol Res*. 2014; 2014: 476068. DOI: [10.1155/2014/476068](https://doi.org/10.1155/2014/476068)
7. Elkadi OM, Madkour GG, Elmenoufy HS, El-Refai M. Evaluation of level of TNF- α in chronic periodontitis patients with gestational diabetes mellitus after phase I periodontal therapy. *Dent*. 2018; 8(4): 1-5. DOI: [10.4172/2161-1122.1000481](https://doi.org/10.4172/2161-1122.1000481)
8. Agidigbi TS, Kim C. Reactive oxygen species in osteoclast differentiation and possible pharmaceutical targets of ROS-mediated osteoclast diseases. *Int J Mol Sci*. 2019; 20(14): 3576. DOI: [10.3390/ijms20143576](https://doi.org/10.3390/ijms20143576)
9. Mescher AL. *Junqueira's Basic Histology: Text and Atlas*. 13th ed. New York: McGraw-Hill International; 2013. p. 138-43.
10. Hikmah N, Shita ADP. Peran RANKL pada proses resorpsi tulang alveolar kondisi diabetes. *Stomatognathic*. 2013; 10(3): 105-9.
11. Herniyati H. The increased number of osteoblast and capillaries in orthodontic tooth movement post-administration of robusta coffee extract. *Dent J*. 2017; 50(2): 91-6. DOI: [10.20473/j.djmk.v50.i2.p91-96](https://doi.org/10.20473/j.djmk.v50.i2.p91-96)
12. Tang X, Han J, Meng H, Zhao Y, Wang H, Liu J, et al. Downregulation of RANKL and RANKL/osteoprotegerin ratio in human periodontal ligament cells during their osteogenic differentiation. *J Periodontal Res*. 2016; 51(1): 125-32. DOI: [10.1111/jre.12291](https://doi.org/10.1111/jre.12291)

13. Kar SK, Bera TK. Phytochemical constituent of Aloe vera and their multi-functional properties: A comprehensive review. *Int J Pharm Sci Res.* 2018; 9(4): 1416-23. DOI: [10.13040/IJPSR.0975-8232.9\(4\).1416-23](https://doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.9(4).1416-23)
14. Dahiya P, Kamal R. Hyaluronic acid: A Boon in Periodontal Therapy. *N Am J Med Sci.* 2013; 5(5): 309-15. DOI: [10.4103/1947-2714.112473](https://doi.org/10.4103/1947-2714.112473)
15. Shaharudin A. Systematic Review of The Effectiveness and Tolerability of Hyaluronic Acid for Acute and Chronic Wounds [tesis]. Kuala Lumpur: University Of Malaya; 2015. p. 15-18.
16. Ermawati T. Potensi Gel Ekstrak Biji Kopi Robusta (*C. robusta*) pada Tikus Periodontitis yang Diinduksi *Porphyromonas gingivalis*. Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember. Laporan Penelitian Dosen Pemula, 2015. h. 1-13.
17. Chu YF. Coffee: Emerging Health Effects and Disease Prevention. Hoboken: John Wiley & Sons, Inc.; 2012. p. 21-58.
18. Farhaty N, Muchtaridi M. Tinjauan kimia dan aspek farmakologi senyawa klorogenat pada biji kopi: Review. *Farmaka.* 2016; 14(1): 214-27. DOI: [10.24198/jf.v14i1.10769](https://doi.org/10.24198/jf.v14i1.10769)
19. Ermawati T, Meilawaty Z, Harmono H. Inhibition activity of robusta coffee bean polyphenol extract on the production of TNF- α neutrophil cells. *Maj Ked Gi Ind.* 2018; 4(2): 114-19. DOI: [10.22146/majkedgiind.28352](https://doi.org/10.22146/majkedgiind.28352)
20. Ermawati T, Nagari DFIGA, Praharani D, Sari DS. Effect of lipopolysaccharide induction of *Porphyromonas gingivalis* on osteoclast and osteoblast cell number of wistar rats (*Rattus norvegicus*) alveolar bone. *Int J Appl Pharm.* 2019; 11(4): 64-7. DOI: [10.22159/ijap.2019.v11s4.35294](https://doi.org/10.22159/ijap.2019.v11s4.35294)
21. Cekici A, Kantarci A, Hasturk H, Van Dyke TE. Inflammatory and immune pathways in the pathogenesis of periodontal disease. *Periodontol* 2000. 2014; 64(1): 57-80. DOI: [10.1111/prd.12002](https://doi.org/10.1111/prd.12002)
22. Yasuhara R, Miyamoto Y. Roles of gingipains in periodontal bone loss. *J Oral Biol.* 2011; 53(3): 197-205. DOI: [10.1016/S1349-0079\(11\)80002-2](https://doi.org/10.1016/S1349-0079(11)80002-2)
23. Pandit N, Changela R, Bali D, Tikoo P, Gugnani S. *Porphyromonas gingivalis*: Its virulence and vaccine. *J Int Clin Dent Res Org.* 2015; 7(1): 51-8. DOI: [10.4103/2231-0754.153496](https://doi.org/10.4103/2231-0754.153496)
24. Shrestha S, Neupane M, Sharma S, Lamsal M. Assessment of tumor necrosis factor-alpha in gingivitis and periodontitis patients. *Int J Dent Res.* 2017; 5(2): 108-11. DOI: [10.14419/ijdr.v5i2.7874](https://doi.org/10.14419/ijdr.v5i2.7874)
25. Farah A, Lima JDP. Consumption of chlorogenic acids through coffee and health implications. *Beverages.* 2019; 5(1): 1-29. DOI: [10.3390/beverages5010011](https://doi.org/10.3390/beverages5010011)
26. Reis AMS, Ribeiro LGR, Ocarino NDM, Goes AM, Serakides R. Osteogenic potential of osteoblast from neonatal rats born to mothers treated with caffeine throughout pregnancy. *BMC Musculoskeletal Disord.* 2015; 16(1): 10. DOI: [10.1186/s12891-015-0467-8](https://doi.org/10.1186/s12891-015-0467-8)
27. Mittal M, Siddiqui MR, Tran K, Reddy SP, Malik AB. Reactive oxygen species in inflammation and tissue injury. *Antioxid Redox Signal.* 2014; 20(7): 1126-67. DOI: [10.1089/ars.2012.5149](https://doi.org/10.1089/ars.2012.5149)
28. Pooja S. Antioxidants and its role in periodontitis. *J Pharm Sci Res.* 2016; 8(8): 759-63.
29. Liang N, Kitts DD. Role of chlorogenic acids in controlling oxidative and inflammatory stress conditions. *Nutrients.* 2016; 8(1): 16. DOI: [10.3390/nu8010016](https://doi.org/10.3390/nu8010016)
30. Pergolizzi S, D'Angelo V, Aragona M, Dugo P, Cacciola F, Capillo G, et al. Evaluation of antioxidant and anti-inflammatory activity of green coffee beans methanolic extract in rat skin. *Nat Prod Res.* 2018; 34(11): 1535-41. DOI: [10.1080/14786419.2018.1523161](https://doi.org/10.1080/14786419.2018.1523161)