

**UJI TOKSISITAS AKUT DOSIS TUNGGAL EKSTRAK KOPI
ROBUSTA (*Coffea canephora*) TERHADAP GAMBARAN
HISTOPATOLOGI KELENJAR ADRENAL TIKUS
PUTIH (*Rattus norvegicus*) GALUR Sprague-Dawley
MENGUNAKAN *GUIDELINE*
UJI OECD NO. 423**

(Skripsi)

Oleh:

**RISKI HANDIANI ANWARI
1818011066**



**FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS LAMPUNG
BANDAR LAMPUNG
2022**

**UJI TOKSISITAS AKUT DOSIS TUNGGAL EKSTRAK KOPI
ROBUSTA (*Coffea canephora*) TERHADAP GAMBARAN
HISTOPATOLOGI KELENJAR ADRENAL TIKUS
PUTIH (*Rattus norvegicus*) GALUR Sprague-Dawley
MENGUNAKAN *GUIDELINE*
UJI OECD NO. 423**

Oleh

RISKI HANDIANI ANWARI

Skripsi

**Sebagai Salah Satu Syarat Untuk Memperoleh Gelar
SARJANA KEDOKTERAN**

Pada

**Fakultas Kedokteran
Universitas Lampung**



**PROGRAM STUDI PENDIDIKAN DOKTER
FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS LAMPUNG
BANDAR LAMPUNG
2022**

Judul Proposal

: **UJI TOKSISITAS AKUT DOSIS TUNGGAL EKSTRAK KOPI ROBUSTA (*Coffea canephora*) TERHADAP GAMBARAN HISTOPATOLOGI KELENJAR ADRENAL TIKUS PUTIH (*Rattus norvegicus*) GALUR Sprague-Dawley MENGGUNAKAN *GUIDELINE* UJI OECD NO. 423**

Nama Mahasiswa

: **Riski Handiani Anwari**

No. Pokok Mahasiswa

: **1818011066**

Program Studi

: **Pendidikan Dokter**

Fakultas

: **Kedokteran**



MENYETUJUI

1. Komisi Pembimbing

**dr. Waluyo Rudiyanto, S.Ked.,
M.Kes., Sp.KKLP
NIP 197610292003121002**

**Ramadhan Triyandi, S.Farm.,
M.Si., Apt
NIP 198705202020121015**

2. Dekan Fakultas Kedokteran



**Prof. Dr. Dyah Wulan S. R. Wardani, S.K.M., M.Kes
NIP. 197206281997022001**

MENGESAHKAN

1. Tim Penguji

**Ketua : dr. Waluyo Rudiyanto, S.Ked.,
M.Kes., Sp.KKLP**

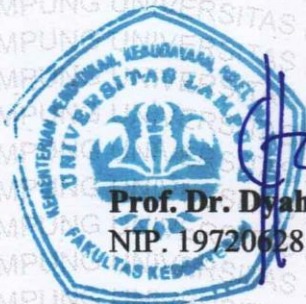
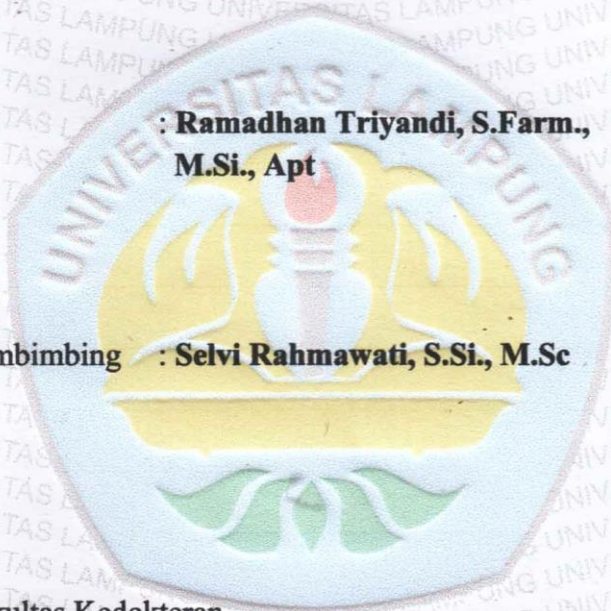
**Sekretaris : Ramadhan Triyandi, S.Farm.,
M.Si., Apt**

**Penguji
Bukan Pembimbing : Selvi Rahmawati, S.Si., M.Sc**

2. Dekan Fakultas Kedokteran

**Prof. Dr. Dyah Wulan S. R. Wardani, SKM., M.Kes
NIP. 197206281997022001**

Tanggal Lulus Ujian Skripsi : 28 April 2022



Three handwritten signatures in black ink are present on the right side of the document, corresponding to the members of the examination team.

LEMBAR PERNYATAAN

Dengan ini saya menyatakan dengan sebenarnya bahwa :

1. Skripsi dengan judul **“UJI TOKSISITAS AKUT DOSIS TUNGGAL EKSTRAK KOPI ROBUSTA (*Coffea canephora*) TERHADAP GAMBARAN HISTOPATOLOGI KELENJAR ADRENAL TIKUS PUTIH (*Rattus norvegicus*) GALUR Sprague-Dawley MENGGUNAKAN GUIDELINE UJI OECD NO. 423”** adalah hasil karya saya sendiri dan tidak melakukan penjiplakan atau pengutipan atas karya penulis lain dengan cara tidak sesuai etika ilmiah yang berlaku dalam masyarakat akademik atau yang disebut plagiarisme.
2. Hal intelektual atas karya ilmiah ini diserahkan sepenuhnya kepada Universitas Lampung.

Atas pernyataan ini, apabila di kemudian hari ternyata ditemukan adanya ketidakbenaran, saya bersedia menanggung akibat dan sanksi yang diberikan kepada saya.

Bandar Lampung, 28 April 2022

Pembuat Pernyataan,



Riski Handiani Anwari

RIWAYAT HIDUP

Penulis merupakan anak perempuan yang dilahirkan di Tangerang pada tanggal 19 Oktober 2000 sebagai anak ketiga dari tiga bersaudara dari pasangan Bapak Suwarni Adi dan Ibu N. Tina Kustinah. Penulis memiliki satu kakak laki-laki bernama Risman Anwari dan satu kakak perempuan bernama Riska Handiani Anwari.

Penulis menyelesaikan pendidikan Taman Kanak-Kanak (TK) di TK Bina Insaniyah Kabupaten Tangerang pada tahun 2006, pendidikan Sekolah Dasar (SD) di SDN Cilenggang 2 pada tahun 2012, pendidikan Sekolah Menengah Pertama (SMP) di SMPN 1 Kota Tangerang Selatan pada tahun 2015, dan pendidikan Sekolah Menengah Atas (SMA) di SMAN 2 Kota Tangerang Selatan pada tahun 2018.

Penulis terdaftar sebagai mahasiswa Fakultas Kedokteran Universitas Lampung melalui jalur Seleksi Bersama Masuk Perguruan Tinggi Negeri (SBMPTN) pada tahun 2018. Selama menjadi mahasiswa, penulis aktif mengikuti Lembaga Kemahasiswaan *Lampung University Medical Research* (LUNAR) sebagai anggota pada periode 2018/2019-2019/2020. Penulis juga mengikuti Unit Fungsional Organisasi *Center for Indonesian Medical Students Activities* (CIMSAs) FK Unila sebagai anggota SCORA pada periode 2019/2020.

Karya sederhana ini kupersembahkan untuk kedua orang tua dan kedua kakakku tersayang, yang senantiasa mendoakan keberhasilan setiap langkahku.

فَإِذَا فَرَغْتَ فَانصَبْ

Maka apabila kamu telah selesai (dari sesuatu urusan), kerjakanlah dengan sungguh-sungguh (urusan) yang lain,

وَإِلَىٰ رَبِّكَ فَارْغَبْ

dan hanya kepada Tuhanmulah hendaknya kamu berharap.

(QS. Al Insyirah Ayat 7-8).

SANWACANA

Puji dan syukur penulis panjatkan kepada Allah SWT, Tuhan Yang Maha Pengasih lagi Maha Penyayang, yang telah melimpahkan rahmat serta karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi dengan judul “Uji Toksisitas Akut Dosis Tunggal Ekstrak Kopi Robusta (*Coffea canephora*) Terhadap Gambaran Histopatologi Kelenjar Adrenal Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Galur Sprague-Dawley Menggunakan *Guideline* Uji OECD No. 423” sebagai salah satu syarat untuk mendapatkan gelar Sarjana Kedokteran di Fakultas Kedokteran Universitas Lampung.

Dalam proses penulisan skripsi ini, penulis banyak mendapatkan bantuan, bimbingan, dukungan, saran, dan kritik yang membangun dari berbagai pihak. Maka pada kesempatan ini dengan segala kerendahan hati penulis ingin menyampaikan rasa terimakasih yang sebesar-besarnya kepada :

1. Allah SWT
2. Prof. Dr. Karomani, M.Si., selaku Rektor Universitas Lampung.
3. Prof. Dr. Dyah Wulan Sumekar RW, S.K.M., M.Kes., selaku Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Lampung.
4. dr. Waluyo Rudiyanto, S.Ked., M.Kes., Sp.KKLP selaku pembimbing I atas kesediaan dan kesabarannya dalam membimbing, memberikan masukan, nasihat, motivasi, dan kritik yang membangun kepada penulis selama proses penyusunan skripsi ini.
5. Pak Ramadhan Triyandi, S.Farm., M.Si., Apt selaku pembimbing II atas kesediaan dan kesabarannya dalam membimbing, memberikan masukan, nasihat, motivasi, dan kritik yang membangun kepada penulis selama proses penyusunan skripsi ini.

6. Bu Selvi Rahmawati, S.Si., M.Sc., selaku pembahas yang telah meluangkan waktu untuk memberikan saran dan kritik yang membangun kepada penulis selama proses penyusunan skripsi ini.
7. dr. Merry Indah Sari, S.Ked., M.Med.Ed., selaku Pembimbing Akademik yang telah meluangkan waktu dan tak henti memberikan semangat serta motivasi kepada penulis selama proses perkuliahan di Fakultas Kedokteran Universitas Lampung.
8. Seluruh dosen, staf, dan karyawan Fakultas Kedokteran Universitas Lampung atas ilmu, waktu, dan bantuan yang telah diberikan kepada penulis selama proses perkuliahan. Terutama kepada Mas Bayu Putra Danan Jaya A.Md, Pak Nahrowi, dan Pak Bukhori yang telah banyak memberikan bantuan selama proses penelitian dan penyusunan skripsi ini.
9. Orang tua penulis, Ibu Tina dan Bapak Adi, terimakasih atas segala doa yang selalu dipanjatkan untuk keberhasilan penulis, terimakasih atas dukungan baik moral maupun material, kasih sayang, dan kebahagiaan yang terus diberikan selama ini.
10. Kedua kakak penulis, Mas Risman dan Mbak Riska, terimakasih atas doa dan dukungan yang telah diberikan selama ini.
11. Teman-teman seperjuangan sejak masih menjadi mahasiswa baru, Dyah, Javinka, Raihan, Sari, Ulayya, dan Naomi yang selalu bersedia mengorbankan waktunya untuk menemani dan mendengarkan keluh-kesah penulis, terimakasih telah berjuang bersama dan telah mewarnai kehidupan penulis selama perkuliahan ini.
12. Malyca, Vuthi, Anggin, Eriza, Shafira, dan Charity yang telah berjuang bersama selama proses bimbingan dan penelitian, terimakasih sudah saling menyemangati dan saling menguatkan selama proses penyusunan skripsi ini.
13. Teman-teman DPA 15 “LINGUA”, Dyah, Vuthi, Sezia, Syifa, Salwa, Uli, Panca, David, dan Aqmal, terimakasih atas segala kebaikan yang sudah diberikan selama ini.
14. Teman-teman Angkatan 2018 “F18RINOGEN”, terimakasih atas suka duka yang sudah dilalui bersama.

15. Semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu persatu yang sudah banyak memberikan bantuan dan dukungan kepada penulis selama proses penyusunan skripsi ini.

Semoga Allah SWT senantiasa memberikan rahmat dan balasan yang berlipat atas segala bantuan dan kebaikan yang telah diberikan kepada penulis. Aamiin Yaa Rabbal 'Aalamiin.

Bandar Lampung, 28 April 2022
Penulis,

Riski Handiani Anwari

ABSTRACT

SINGLE DOSE ACUTE TOXICITY TEST OF ROBUSTA COFFEE (*Coffea canephora*) EXTRACT ON ADRENAL GLANDS HISTOPATHOLOGICAL STRUCTURE OF WHITE RAT (*Rattus norvegicus*) Sprague-Dawley STRAIN USING OECD GUIDELINE NO. 432

By

RISKI HANDIANI ANWARI

Background: Coffee is one of the most widely consumed drinks by people worldwide. Coffee consumption is known to provide many benefits, but if consumed in excess, it can have harmful effects on the body, such as stimulating stress and causing damage to the adrenal glands. This study aims to determine the effect of a single dose acute toxicity test of robusta coffee extract (*Coffea canephora*) on adrenal glands histopathological structure of white rats (*Rattus norvegicus*) Sprague-Dawley strain using OECD guideline No. 423.

Methods: This research is quasi-experimental with a post-test only control group design. The study was conducted based on OECD guidelines No.423 using 18 rats divided into 6 groups: K (CMC-Na 1%); Groups that treated with robusta coffee extract P1 (2000 mg/kgBW); P2 (300 mg/kgBW); P3 (50 mg/kgBW); P4 (5 mg/kgBW); and P5 (5000 mg/kgBW). Histopathology of the adrenal glands was assessed by measuring the area of the medulla and the thickness of the adrenal cortex.

Result: The LD₅₀ value of robusta coffee extract is 2500 mg/kgBW. Observations were made on 3 groups: K, P1, and P5. The results of the mean area of the medulla adrenal are K=0,784 mm²; P1=1,539 mm²; P5=1,529 mm². One Way ANOVA test obtained p=0,048. The results of the average thickness of the cortex adrenal are K=913,44 μm; P1=1023,30 μm, P5=1180,82 μm. One Way ANOVA test obtained p=0,010.

Conclusion: There is an effect of a single dose acute toxicity test of robusta coffee extract (*Coffea canephora*) on adrenal glands histopathological structure of white rat (*Rattus norvegicus*) Sprague-Dawley strain using OECD guideline no. 423.

Keywords: Acute toxicity test, Adrenal gland histopathology, OECD No. 423, Robusta coffee.

ABSTRAK

UJI TOKSISITAS AKUT DOSIS TUNGGAL EKSTRAK KOPI ROBUSTA (*Coffea canephora*) TERHADAP GAMBARAN HISTOPATOLOGI KELENJAR ADRENAL TIKUS PUTIH (*Rattus norvegicus*) GALUR Sprague-Dawley MENGGUNAKAN *GUIDELINE* UJI OECD NO. 423

Oleh

RISKI HANDIANI ANWARI

Latar Belakang: Kopi merupakan salah satu minuman yang banyak dikonsumsi masyarakat di seluruh dunia. Konsumsi kopi dikenal dapat memberikan banyak manfaat, tetapi apabila dikonsumsi secara berlebihan kopi dapat memberikan efek buruk bagi tubuh, seperti dapat merangsang terjadinya stres sehingga menyebabkan kerusakan pada kelenjar adrenal. Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui pengaruh uji toksisitas akut dosis tunggal ekstrak kopi robusta (*Coffea canephora*) terhadap gambaran histopatologi kelenjar adrenal tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur Sprague-Dawley menggunakan *guideline* uji OECD No.423.

Metode: Penelitian ini adalah *quasi experimental* dengan rancangan *post-test only control group design*. Penelitian ini dilakukan sesuai *guideline* OECD No.423 dengan menggunakan 18 ekor tikus yang terbagi dalam 6 kelompok: K (CMC-Na 1%); Perlakuan ekstrak kopi robusta P1 (2000 mg/kgBB); P2 (300 mg/kgBB); P3 (50 mg/kgBB); P4 (5 mg/kgBB); dan P5 (5000 mg/kgBB). Histopatologi kelenjar adrenal dinilai dengan mengukur luas area medula dan ketebalan korteks adrenal.

Hasil: Nilai LD₅₀ dari ekstrak kopi robusta yaitu 2500 mg/kgBB. Selanjutnya dilakukan pengamatan terhadap 3 kelompok yaitu K, P1, dan P5. Hasil rerata luas area medula yaitu K=0,784 mm²; P1=1,539 mm²; P5=1,529 mm². Uji *One Way ANOVA* didapatkan p=0,048. Hasil rerata ketebalan korteks yaitu K=913,44 μm; P1=1023,30 μm, P5=1180.82 μm. Uji *One Way ANOVA* didapatkan p=0,010.

Kesimpulan: Terdapat pengaruh uji toksisitas akut dosis tunggal ekstrak kopi robusta (*Coffea canephora*) terhadap gambaran histopatologi kelenjar adrenal tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur Sprague-Dawley menggunakan *guideline* uji OECD No.423.

Kata Kunci: Histopatologi kelenjar adrenal, Kopi robusta, OECD No. 423, Uji toksisitas akut.

DAFTAR ISI

	Halaman
DAFTAR ISI	vii
DAFTAR TABEL	x
DAFTAR GAMBAR	xi
DAFTAR LAMPIRAN	xii
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	4
1.3 Tujuan Penelitian.....	4
1.4 Manfaat Penelitian.....	5
1.4.1 Manfaat Bagi Peneliti	5
1.4.2 Manfaat Bagi Masyarakat.....	5
1.4.3 Manfaat Bagi Institusi Pendidikan.....	5
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	6
2.1 Kopi.....	6
2.1.1 Pengertian Kopi	6
2.1.2 Karakteristik Kopi Robusta	7
2.1.3 Kandungan Kopi	9
2.2 Kelenjar Adrenal	12
2.2.1 Anatomi Kelenjar Adrenal.....	12
2.2.2 Fisiologi Kelenjar Adrenal.....	14
2.2.3 Histologi Kelenjar Adrenal	19
2.3 Pengaruh Kopi Terhadap Kelenjar Adrenal	21
2.4 Uji Toksisitas.....	23
2.4.1 Definisi.....	23
2.4.2 Uji Toksisitas Akut Oral	23
2.4.3 Metode Uji OECD <i>Guideline</i> No. 423.....	24
2.5 Tikus Putih (<i>Rattus norvegicus</i>) Galur Sprague-Dawley	27
2.6 Kerangka Penelitian	29

2.6.1 Kerangka Teori	29
2.6.2 Kerangka Konsep.....	30
BAB III METODE PENELITIAN.....	31
3.1 Desain Penelitian.....	31
3.2 Tempat dan Waktu Penelitian	31
3.2.1 Tempat Penelitian	31
3.2.2 Waktu Penelitian.....	32
3.3 Subjek Penelitian.....	32
3.3.1 Populasi Penelitian.....	32
3.3.2 Sampel Penelitian	32
3.3.3 Kriteria Inklusi	32
3.3.4 Kriteria Eksklusi	33
3.3.5 Kelompok Perlakuan.....	33
3.4 Identifikasi Variabel Penelitian	33
3.4.1 Variabel Bebas	33
3.4.2 Variabel Terikat	34
3.5 Definisi Operasional.....	34
3.6 Instrumen Penelitian.....	34
3.6.1 Alat Penelitian.....	34
3.6.2 Bahan Penelitian	35
3.7 Prosedur Penelitian.....	36
3.7.1 Aklimatisasi Hewan Coba.....	36
3.7.2 Proses Penyangraian Kopi	37
3.7.3 Pembuatan dan Perhitungan Dosis Ekstrak Kopi Robusta	37
3.7.4 Intervensi Hewan Coba.....	41
3.7.5 Terminasi Hewan Coba	42
3.7.6 Proses Pembuatan Preparat	42
3.7.7 Pewarnaan <i>Hematoxylin-Eosin</i>	44
3.7.8 Pengamatan Preparat di Bawah Mikroskop.....	45
3.8 Pengolahan Data.....	45
3.9 Analisis Data	46
3.10 Alur Penelitian.....	47
3.11 <i>Ethical Clearance</i>	48
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	49
4.1 Hasil	49
4.1.1 Uji Toksisitas Akut	49
4.1.2 Gambaran Histopatologi Kelenjar Adrenal	50
4.1.3 Analisis Hasil Gambaran Histopatologi Kelenjar Adrenal.....	55
4.2 Pembahasan	60

4.3 Keterbatasan Penelitian	65
BAB V SIMPULAN DAN SARAN	66
5.1 Simpulan.....	66
5.2 Saran.....	66
DAFTAR PUSTAKA.....	67
LAMPIRAN	75

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
2. 1 Kadar Kafein Pada Kopi.....	10
2. 2 Kandungan Senyawa Kimia Pada Kopi Arabika dan Robusta.....	12
2. 3 Kriteria Penggolongan Toksisitas Akut Berdasarkan LD ₅₀	25
2. 4 Kriteria Penggolongan Sediaan Uji Menurut OECD	26
3. 1 Kelompok Perlakuan	33
3. 2 Definisi Operasional.....	34
4. 1 Data Luas Area Medula Adrenal	56
4. 2 Hasil Uji <i>Post-Hoc</i> LSD Luas Area Medula Adrenal	57
4. 3 Data Ketebalan Korteks Adrenal.....	58
4. 4. Hasil Uji <i>Post-Hoc</i> LSD Ketebalan Korteks Adrenal	59

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
2. 1 Tanaman Kopi Robusta	8
2. 2 Biji Kopi Robusta.....	9
2. 3 Struktur Kimia Kafein.....	9
2. 4 Anatomi Kelenjar Adrenal	14
2. 5 Jalur Steroidogenik.....	16
2. 6 Histologi Kelenjar Adrenal	20
2. 7 Prosedur Uji Toksisitas Akut Berdasarkan OECD No. 423.....	27
2. 8 Tikus Putih (<i>Rattus norvegicus</i>) Galur Sprague-Dawley	28
2. 9 Kerangka Teori.....	29
2. 10 Kerangka Konsep	30
3. 1 Prosedur Ekstraksi Kopi Menggunakan Metode Maserasi	37
3. 2 Alur Penelitian.....	47
4. 1 Gambaran Luas Area Medula Adrenal Kelompok Kontrol	50
4. 2 Gambaran Luas Area Medula Adrenal Kelompok P1.....	51
4. 3 Gambaran Luas Area Medula Adrenal Kelompok P5.....	52
4. 4 Gambaran Ketebalan Korteks Adrenal Kelompok Kontrol	53
4. 5 Gambaran Ketebalan Korteks Adrenal Kelompok P1.	54
4. 6 Gambaran Ketebalan Korteks Adrenal Kelompok P5	55

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1. Persetujuan Etik Penelitian.....	76
Lampiran 2. Surat Keterangan Pembuatan Ekstrak	77
Lampiran 3. Surat Peminjaman <i>Animal House</i>	78
Lampiran 4. Surat Peminjaman Laboratorium Histologi.....	79
Lampiran 5. Disposisi Peminjaman Laboratorium Histologi	80
Lampiran 6. Gambaran Histopatologi Kelenjar Adrenal	81
Lampiran 7. Hasil Pembacaan Preparat	83
Lampiran 8. Hasil Analisis Statistik	85
Lampiran 9. Dokumentasi Penelitian.....	89

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Kopi merupakan salah satu jenis minuman yang banyak dikonsumsi oleh masyarakat di seluruh dunia (Kim *et al.*, 2019). Hasil riset *National Coffee Drinking Trends* (NCTD) tahun 2013 menunjukkan bahwa 63% dari masyarakat yang berusia 25-39 tahun mengonsumsi kopi setiap harinya. Data tersebut menunjukkan adanya peningkatan persentase konsumen kopi sebanyak 5% dari tahun 2012 dan peningkatan sebanyak 44% dari tahun 2011 (*National Coffee Association*, 2013). Akibat jumlah konsumen kopi yang meningkat, jumlah kopi yang dikonsumsi masyarakat pun ikut meningkat. Data *International Coffee Organization* menunjukkan bahwa jumlah kopi yang dikonsumsi masyarakat di seluruh dunia pada tahun 2020/2021 mengalami peningkatan sebanyak 1,9% dari tahun 2019/2020, yaitu dari 164,43 juta kantong menjadi sekitar 167,58 juta kantong kopi, dengan satu kantong terdiri atas 60 kg kopi (*International Coffee Organization*, 2021).

Kopi juga merupakan salah satu hasil komoditas perkebunan yang banyak diproduksi di seluruh dunia. Pada tahun 2020, jumlah produksi kopi secara global yaitu sekitar 175.347 juta kantong kopi. Indonesia sendiri merupakan negara dengan jumlah produksi kopi terbanyak di dunia setelah Brazil, Vietnam, dan Kolombia dengan jumlah produksi kopi sebanyak 11.950 juta kantong kopi pada tahun 2020 (*International Coffee Organization*, 2021). Provinsi Lampung merupakan salah satu daerah sentral penghasil kopi di Indonesia dengan jumlah produksi kopi yang tinggi. Pada tahun 2019, total

produksi buah kopi di Provinsi Lampung yaitu sebanyak 115.689 ton dengan luas area perkebunan kopi sebesar 157.000 ha. Tingginya jumlah produksi kopi di Provinsi Lampung menjadikan Provinsi Lampung sebagai sentral produksi kopi terbesar kedua di Indonesia (Badan Pusat Statistik, 2020).

Secara umum, terdapat empat varietas kopi yaitu kopi robusta, kopi arabika, kopi ekselsa, dan kopi liberika. Kopi robusta dan kopi arabika merupakan varietas kopi yang banyak dibudidayakan di Indonesia. Sebanyak 72,66% dari total produksi kopi di Indonesia merupakan kopi robusta dan 27,34% sisanya adalah kopi arabika (Kementerian Pertanian, 2021). Kopi robusta menjadi varietas kopi yang paling banyak dibudidayakan oleh para petani di Indonesia karena kopi robusta memiliki syarat tumbuh serta pemeliharaan yang ringan dibandingkan dengan kopi jenis lainnya. Kopi robusta juga memiliki harga yang lebih murah dan rasa yang lebih pahit dibandingkan dengan kopi arabika sehingga kopi robusta sering disebut sebagai kopi kelas dua (Rahardjo, 2012).

Kopi mengandung berbagai jenis senyawa kimia seperti asam klorogenat, kafein, kafestol, kahweol, oksalat, tanin, tiamin, trigonelin, asam amino, mikronutrien, dan senyawa lainnya (Sharma, 2020). Setiap varietas kopi memiliki jumlah kandungan masing-masing senyawa yang berbeda, seperti pada kopi robusta yang mengandung asam klorogenat serta kafein dalam jumlah yang lebih tinggi dibandingkan dengan kopi arabika (Rahardjo, 2012). Kandungan senyawa yang terdapat pada kopi dapat memberikan berbagai efek pada tubuh manusia, baik itu efek negatif maupun efek positif. Asam klorogenat merupakan salah satu senyawa antioksidan pada kopi yang berperan penting dalam mencegah berbagai penyakit yang berhubungan dengan stres oksidatif dan juga dikenal sebagai anti-diabetes (Lee *et al.*, 2016). Kandungan lain pada kopi yang juga banyak memberikan manfaat pada tubuh yaitu kafein. Kafein berperan dalam penurunan kadar kolesterol dan juga sebagai neuroprotektif, yaitu dapat menurunkan risiko terjadinya penyakit Alzheimer serta Parkinson (Butt & Sultan, 2011).

Konsumsi kopi juga dapat memberikan efek buruk pada tubuh terutama apabila dikonsumsi secara berlebihan. Kafein merupakan salah satu senyawa pada kopi yang diduga memberikan banyak efek merugikan pada tubuh apabila dikonsumsi dalam jumlah yang berlebihan. Jumlah konsumsi kafein yang direkomendasikan oleh *Food Drug Administration* (FDA) yaitu tidak lebih dari 100-200 mg/hari. Efek samping jangka pendek yang sering muncul akibat mengonsumsi kafein dalam jumlah yang berlebihan yaitu sakit kepala, mual, insomnia, dan *anxiety* (Owolabi *et al.*, 2017). Kafein yang ada pada kopi juga dapat menyebabkan terjadinya berbagai penyakit seperti hipertensi, gastritis, osteoporosis, dan bahkan dapat mempengaruhi fertilitas (Dorostghoal *et al.*, 2012).

Penelitian lain juga menyatakan bahwa konsumsi kopi secara berlebihan dapat memicu terjadinya stres pada seseorang dan menyebabkan terjadinya peningkatan sekresi hormon kortisol serta epinefrin (Flueck *et al.*, 2016; Ryu & Roh, 2019). Kortisol dan epinefrin merupakan suatu hormon yang disekresikan oleh kelenjar adrenal dan memegang peranan penting dalam mekanisme adaptasi terhadap stres (Thau *et al.*, 2021). Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Lovallo *et al.* (2005), pemberian kafein sebanyak 300 mg/hari dan 600 mg/hari selama 30 hari dapat menyebabkan terjadinya peningkatan kadar hormon kortisol pada seseorang. Pemberian kafein dalam dosis yang berlebihan tidak hanya dapat menyebabkan peningkatan hormon kortisol dan epinefrin saja, tetapi juga dapat menyebabkan terjadinya perubahan gambaran histopatologi pada kelenjar adrenal. Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Ryu & Roh (2019), pemberian kafein sebanyak 180 mg/hari selama 30 hari dapat menyebabkan terjadinya perubahan gambaran histopatologi pada kelenjar adrenal berupa pembesaran area medula, peningkatan ketebalan korteks adrenal, dilatasi sinusoidal, dan vakuolisasi sitoplasma.

Penelitian mengenai pengaruh pemberian kopi dalam dosis tinggi terhadap kadar hormon kortisol dan epinefrin sudah banyak dilakukan, akan tetapi hingga saat ini penelitian mengenai pengaruh pemberian kopi dalam dosis tinggi terhadap gambaran histopatologi kelenjar adrenal masih sangat jarang dilakukan dan hingga saat ini belum terdapat informasi mengenai tingkat keamanan dosis konsumsi kopi terhadap kelenjar adrenal. Berdasarkan latar belakang tersebut, penulis tertarik untuk melakukan pengamatan mengenai uji toksisitas akut dosis tunggal ekstrak kopi robusta (*Coffea canephora*) terhadap gambaran histopatologi kelenjar adrenal tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur Sprague-Dawley menggunakan *guideline* uji OECD No. 423. *Guideline* uji OECD No. 423 dipilih sebagai panduan pada penelitian ini karena *guideline* ini sudah disesuaikan dengan kriteria toksisitas berdasarkan *Global Harmonized System (GHS)* sehingga sudah diakui secara internasional.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang masalah tersebut, maka rumusan masalah dari penelitian ini adalah “Apakah terdapat pengaruh uji toksisitas akut dosis tunggal ekstrak kopi robusta (*Coffea canephora*) terhadap gambaran histopatologi kelenjar adrenal tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur Sprague-Dawley menggunakan *guideline* uji OECD No. 423?”

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini yaitu untuk mengetahui pengaruh uji toksisitas akut dosis tunggal ekstrak kopi robusta (*Coffea canephora*) terhadap gambaran histopatologi kelenjar adrenal tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur Sprague-Dawley menggunakan *guideline* uji OECD No. 423.

1.4 Manfaat Penelitian

1.4.1 Manfaat Bagi Peneliti

Manfaat penelitian ini bagi peneliti yaitu sebagai tambahan pengetahuan dan pengalaman peneliti dalam melakukan penelitian kesehatan mengenai topik yang dibahas yaitu uji toksisitas akut dosis tunggal ekstrak kopi robusta (*Coffea canephora*) terhadap gambaran histopatologi kelenjar adrenal tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur Sprague-Dawley menggunakan *guideline* uji OECD No. 423.

1.4.2 Manfaat Bagi Masyarakat

Manfaat penelitian ini bagi masyarakat yaitu hasil dari penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi mengenai tingkat keamanan konsumsi kopi robusta (*Coffea canephora*) dosis tunggal terhadap organ kelenjar adrenal.

1.4.3 Manfaat Bagi Institusi Pendidikan

Manfaat penelitian ini bagi institusi pendidikan yaitu dapat dijadikan sebagai sumber kepustakaan mengenai hasil uji toksisitas akut dosis tunggal ekstrak kopi robusta (*Coffea canephora*) terhadap gambaran histopatologi kelenjar adrenal tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur Sprague-Dawley menggunakan *guideline* uji OECD No. 423.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Kopi

2.1.1 Pengertian Kopi

Kopi merupakan tanaman perkebunan yang banyak tumbuh pada daerah tropis dan merupakan salah satu hasil komoditas perkebunan yang memiliki nilai ekonomis yang tinggi dibandingkan dengan jenis tanaman perkebunan lainnya (Nurdiansyah *et al.*, 2017; Hamni *et al.*, 2013). Kopi menempati urutan kedua dari semua komoditas pangan yang paling banyak dikonsumsi dan diperdagangkan di seluruh dunia (Farhaty & Muchtaridi, 2016). Kopi berperan penting sebagai sumber devisa negara dan juga berperan sebagai sumber penghasilan bagi tidak kurang dari satu setengah juta jiwa petani kopi di Indonesia (Rahardjo, 2012).

Tanaman kopi ditemukan pertama kali pada abad ke-9 di Ethiopia. Pada saat itu, bangsa Ethiopia menjadikan biji kopi sebagai salah satu bahan makanan mereka. Pada abad ke-17, tanaman ini kemudian mulai dikembangkan di India, lalu menyebar ke Benua Eropa dan dilanjutkan ke berbagai negara lain (Panggabean, 2011). Tanaman kopi mulai dibudidayakan di Indonesia pada tahun 1696 oleh *Vereenigde Oostindische Compagnie* (VOC). Pulau Jawa merupakan daerah pertama di Indonesia yang mulai membudidayakan tanaman ini. *Vereenigde Oostindische Compagnie* (VOC) kemudian menganggap bahwa tanaman ini cukup menguntungkan sebagai komoditas perdagangan sehingga mereka mulai memperkenalkan tanaman ini ke berbagai daerah lain di

Indonesia agar dapat dibudidayakan juga pada daerah tersebut (Prastowo, 2012).

Terdapat sekitar 70 spesies kopi, di antaranya yaitu kopi robusta, kopi arabika, kopi ekselsa, dan kopi liberika. Kopi robusta dan kopi arabika merupakan dua spesies kopi yang dibudidayakan dalam skala yang sangat besar dan merupakan jenis kopi yang paling banyak dibudidayakan di Indonesia (Kementerian Pertanian, 2021). Spesies kopi yang lain yaitu kopi ekselsa dan kopi liberika hanya diproduksi sekitar 2% dari total keseluruhan produksi kopi dunia sehingga masih sangat jarang dibudidayakan di seluruh dunia termasuk di Indonesia (Rahardjo, 2012).

2.1.2 Karakteristik Kopi Robusta

Menurut Rahardjo (2012), taksonomi kopi robusta (*Coffea canephora*) adalah sebagai berikut:

Kingdom : Plantae
Subkingdom : Tracheobionta
Super Divisi : Spermatophyta
Divisi : Magnoliopsida
Sub Kelas : Asteridae
Ordo : Rubiales
Famili : Rubiaceae
Genus : Coffea
Spesies : *Coffea canephora*

Kopi robusta berasal dari kata “*Robust*” yang artinya kuat. Sesuai dengan namanya, kopi robusta merupakan salah satu jenis tanaman kopi yang bersifat cukup resisten terhadap berbagai penyakit sehingga proses perawatannya cenderung lebih mudah dibandingkan dengan jenis kopi

lainnya. Mudahnya proses pemeliharaan atau perawatan tanaman kopi robusta menjadikan kopi jenis ini sebagai jenis tanaman kopi yang paling banyak dibudidayakan oleh para petani di Indonesia (Rahardjo, 2012).

Tanaman kopi robusta dapat tumbuh dengan sangat baik pada ketinggian 400-700 m di atas permukaan laut pada tanah dengan tingkat keasaman (pH) sekitar 5-6,5 dan pada lingkungan dengan temperatur sekitar 21-24°C. Tanaman ini akan berbuah dengan baik dalam waktu sekitar 3-4 bulan dalam setahun dan sangat cocok ditanam pada daerah tropis yang basah. Tanaman kopi robusta memiliki daun berbentuk bulat dengan ujung sedikit meruncing serta memiliki karakteristik fisik biji agak bulat, lengkungan tebal dan garis tengah dari atas ke bawah hampir rata (Panggabean, 2011). Kopi robusta mengandung lebih banyak kafein pada biji kopinya sehingga rasa kopi robusta cenderung lebih pahit (Haryanto, 2012). Kopi robusta juga memiliki aroma kuat yang khas serta mengandung banyak asam klorogenat pada biji kopinya (Ludwid *et al.*, 2015).



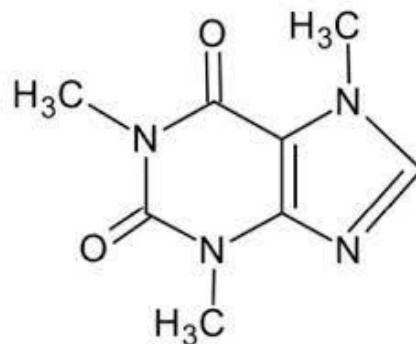
Gambar 2. 1. Tanaman Kopi Robusta (Rahardjo, 2012).



Gambar 2. 2. Biji Kopi Robusta (Panggabean, 2011).

2.1.3 Kandungan Kopi

Kopi mengandung berbagai jenis senyawa kimia seperti asam klorogenat, kafein, kafestol, kahweol, oksalat, tanin, tiamin, trigonelin, asam amino, mikronutrien, dan senyawa lainnya (Sharma, 2020). Kandungan berbagai senyawa yang terdapat pada kopi dapat memberikan berbagai efek pada tubuh manusia, baik itu efek negatif maupun efek positif. Kafein merupakan senyawa kimia utama yang terdapat dalam kopi yang bersifat psikoaktif dan merupakan senyawa alkaloid heterosiklik golongan *methylxanthine* dengan struktur dua-cincin atau dual-siklik (Amaresh *et al.*, 2011).



Gambar 2. 3. Struktur Kimia Kafein (Sari & Kuntari, 2019).

Kopi robusta memiliki kadar kafein yang lebih tinggi dibandingkan dengan kopi arabika. Perbedaan kadar kafein tidak hanya berdasarkan jenis kopinya saja, tetapi juga dipengaruhi oleh tingkat penyangraian kopi (Nieber, 2017). Penelitian sebelumnya mengatakan bahwa aktivitas antioksidan, termasuk kafein, tertinggi pada kopi robusta dengan tingkat penyangraian *light roast* (Vignoli *et al.*, 2014).

Jumlah kafein yang terkandung di dalam kopi juga bergantung dengan metode penyajian yang digunakan (Dewi *et al.*, 2012). Perbedaan kadar ini dapat menyebabkan terjadinya perbedaan efek kafein terhadap fisiologis tubuh. Konsumsi kafein dapat meningkatkan metabolisme tubuh, pengeluaran energi, oksidasi lipid, dan lipolisis. Kafein sebagai antagonis reseptor adenosin dapat berdampak langsung menurunkan kerja adenosin dan menyebabkan peningkatan aktivitas sistem saraf pusat. Aktivasi sistem saraf pusat ini akan membuat tubuh tetap terjaga, meningkatkan kewaspadaan, serta gelisah. Kafein juga dapat meningkatkan glukosa darah dan menurunkan sensitivitas insulin yang disebabkan oleh pelepasan katekolamin yang bekerja meningkatkan glikogenolisis di hepar dan otot rangka (Swastika, 2012).

Tabel 2. 1. Kadar Kafein Pada Kopi

Penyajian Kopi	Konten Kafein
<i>Drip method</i>	135 mg per 240 mL
<i>Percolate</i>	160 mg per 280 mL
<i>Instant</i>	95-120 mg per 240 mL
<i>Espresso</i>	30-50 mg per 30 mL
<i>Flavored</i>	25-100 mg per 240 mL
<i>Brewed decaffeinated</i>	5-7 mg per 240 mL
<i>Instant decaffeinated</i>	3-4 mg per 240 mL

(Belitz *et al.*, 2009).

Kandungan senyawa lain yang terdapat dalam kopi yaitu asam klorogenat. Asam klorogenat merupakan suatu senyawa fenolik utama di dalam kopi yang terbentuk dari esterifikasi asam kuintat dan asam sinamat tertentu seperti kafein, asam ferulat, dan *pcoumaric* (Wei & Tanokuro, 2015). Dibandingkan dengan biji kopi jenis lainnya, kopi robusta memiliki nilai asam klorogenat yang paling banyak, yaitu mencapai 6,1-11,3 mg per gram biji kopi (Farah, 2012).

Asam klorogenat pada kopi dikenal memiliki banyak manfaat pada tubuh yaitu sebagai anti-diabetes, anti-kanker, anti-inflamasi, dan hepatoprotektif (Tajik *et al.*, 2017). Asam klorogenat yang merupakan senyawa antioksidan juga memiliki kemampuan untuk menghambat aktivitas dari enzim xantin oksidase sehingga dapat menurunkan kadar asam urat pada penderita hiperurisemia (Dewajanti, 2019). Asam klorogenat juga dapat memberikan efek yang buruk bagi tubuh, terutama apabila dikonsumsi secara berlebihan. Konsumsi asam klorogenat secara berlebihan dalam waktu yang singkat diduga dapat meningkatkan kadar homosistein yang berhubungan dengan risiko terjadinya penyakit jantung (Miranda *et al.*, 2017).

Kopi juga mengandung senyawa diterpen alami berupa kafestol dan kahweol. Kafestol dan kahweol memiliki sifat hepatoprotektif dan juga anti-kanker. Senyawa diterpen pada kopi, terutama kafestol, memiliki efek buruk bagi tubuh yaitu dapat meningkatkan kadar trigliserida dan juga *Low Density Lipoprotein* (LDL) sehingga dapat meningkatkan risiko terjadinya penyakit kardiovaskular apabila dikonsumsi secara berlebihan (Ren *et al.*, 2019).

Senyawa kimia yang terdapat dalam kopi tidak hanya kafein, asam klorogenat, kafestol, dan kahweol saja, tetapi masih terdapat banyak

kandungan senyawa lain dalam kopi sebagaimana yang tertera pada tabel 2.2 (Farah, 2012).

Tabel 2. 2. Kandungan Senyawa Kimia Pada Kopi Arabika dan Robusta

Komponen	Konsentrasi (g/100g)		Konsentrasi (g/100g)	
	<i>Green Coffea arabica</i>	<i>Roasted Coffea arabica</i>	<i>Green Coffea canephora</i>	<i>Roasted Coffea canephora</i>
Sukrosa	6-9	4,2	0,9-4	1,6
Gula Pereduksi	0,1	0,3	0,4	0,3
Polisakarida	34-44	32-33	48-55	37
Lignin	3	3	3	3
Protein	10-11	7,5-10	10-11	7,5-10
Asam amino bebas	0,5	-	0,8-1	-
Kafein	0,9-1,3	1,1-1,3	1,5-2,5	2,4-2,5
Trigonelin	0,6-2	1,2-0,2	0,6-0,7	0,7-0,3
Asam nikotinic	-	0,016-0,026	-	0,014-0,025
Minyak kopi	15-17	17	7-10	11
Diterpen	0,5-1,2	0,9	0,2-0,8	0,2
Mineral	3-4,2	4,5	4,4-4,5	47
Asam klorogenat	4,1-7,9	1,9-2,5	6,1-11,3	3,3-3,8
Asam alifatik	1	1,6	1	1,6
Asam quinic	0,4	0,8	0,4	1,0
Melanoidins	-	25	-	25
Pectin	2	2	2	2

(Farah, 2012)

2.2 Kelenjar Adrenal

2.2.1 Anatomi Kelenjar Adrenal

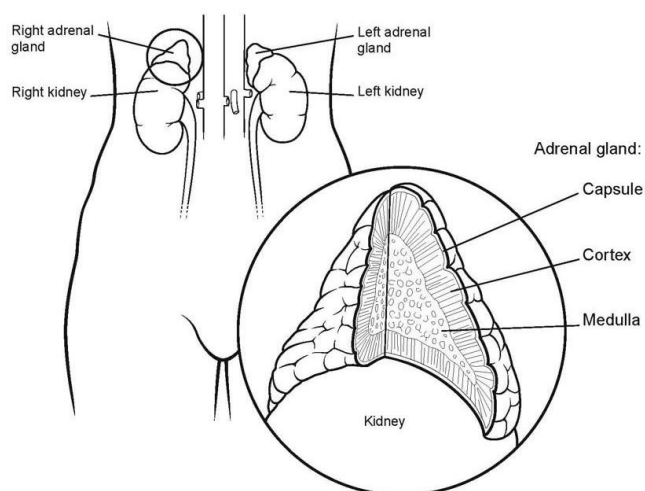
Kelenjar adrenal atau bisa juga disebut sebagai kelenjar suprarenal merupakan bagian penting dari sistem endokrin. Kelenjar adrenal berjumlah dua buah dan masing-masing terletak di kutub atas ginjal pada facies renalis. Pada satu sisi, kelenjar adrenal dipisahkan dari kapsula

fibrosa renis oleh suatu lapisan lemak tipis dan pada sisi lain kelenjar adrenal bersama dengan ginjal terletak di dalam kapsula adiposa perirenalis (Schunke *et al.*, 2017). Kelenjar adrenal sebelah kanan berbentuk seperti piramida dan terletak tepat di bawah liver, sebelah posterior dari vena cava inferior dan sebelah anterior dari diafragma. Kelenjar adrenal sebelah kiri berbentuk seperti bulan sabit dan terletak di bagian media dari spleen, sebelah superior dari arteri dan vena splenika serta sebelah anterior dari diafragma. Masing-masing kelenjar adrenal memiliki tinggi sekitar 50 mm, lebar 30 mm, dan ketebalan 10 mm dengan berat masing-masing kelenjar adrenal sekitar 4-5 gram (Megha *et al.*, 2021).

Kelenjar adrenal terdiri atas dua bagian yaitu korteks pada bagian luar dan medula pada bagian dalam (Gabriel, 2016). Bagian korteks adrenal berukuran lebih besar dibandingkan dengan bagian medula yang hanya menyumbang sekitar 15% dari keseluruhan kelenjar adrenal, cenderung lebih tebal dan berwarna lebih kuning dibandingkan dengan bagian medula yang berwarna coklat kemerahan (Megha *et al.*, 2021). Secara embriologi, korteks adrenal merupakan derivat mesoderm dan berkembang paravertebral di dalam zona yang disebut sebagai zona steroidogen, sedangkan bagian medula adrenal merupakan derivat krista neuralis sehingga berasal dari ektoderm (Schunke *et al.*, 2017).

Kelenjar adrenal berfungsi menyekresikan berbagai hormon, untuk dapat menjalankan fungsinya tersebut maka kelenjar adrenal membutuhkan suplai darah dan vaskularisasi yang sangat baik (Gabriel, 2016). Kelenjar adrenal mendapatkan suplai darah dari tiga arteri utama yaitu arteri suprarenalis superior yang berasal dari arteri frenikus inferior, arteri suprarenalis media yang berasal dari aorta abdominalis dan arteri suprarenalis inferior yang berasal dari arteri renalis (Wright & Burns, 2020). Ketiga arteri ini hanya disertai satu vena yaitu vena suprarenalis

(Schunke *et al.*, 2017). Drainase vena dari kelenjar adrenal dipengaruhi oleh posisi dari kelenjar adrenal. Secara anatomis, kelenjar adrenal kiri berada jauh dari vena cava inferior sehingga vena suprarenalis sinistra akan bermuara ke vena renalis sinistra, sedangkan untuk vena suprarenalis dextra akan bermuara langsung di vena cava inferior karena lokasinya lebih dekat dengan vena cava inferior (Siebert *et al.*, 2017).



Gambar 2. 4. Anatomi Kelenjar Adrenal (Gabriel, 2016).

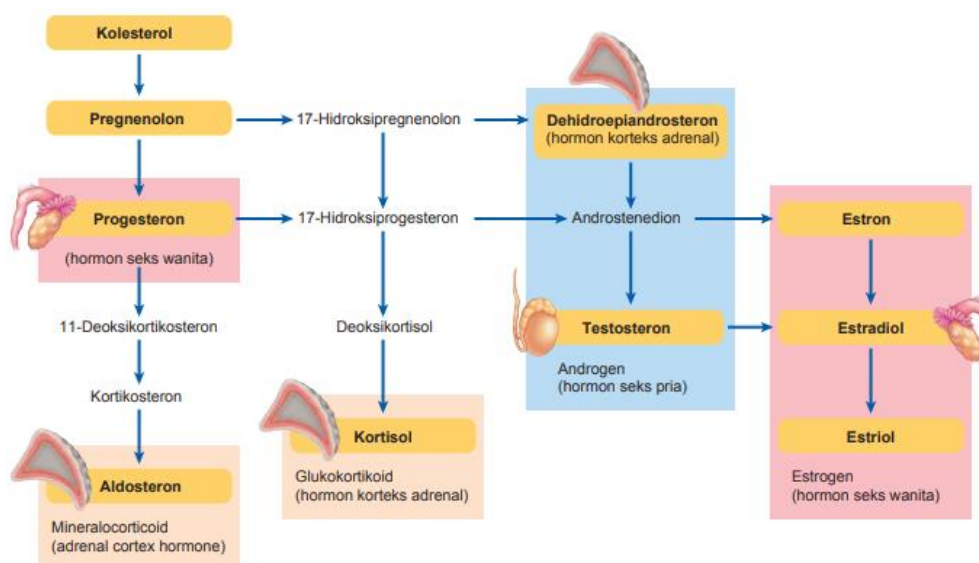
2.2.2 Fisiologi Kelenjar Adrenal

Kelenjar adrenal merupakan suatu organ endokrin yang terdiri atas dua bagian yaitu korteks pada bagian luar dan medula pada bagian dalam. Korteks adrenal terdiri atas tiga zona dengan fungsional dan struktur histologi yang berbeda yaitu zona glomerulosa, zona fasikulata, dan zona retikularis (Burford *et al.*, 2017). Setiap zona akan menghasilkan hormon steroid yang berbeda. Zona glomerulosa yang merupakan lapisan terluar akan menghasilkan mineralokortikoid berupa aldosteron. Zona fasikulata yang merupakan lapisan tengah dan terbesar akan menghasilkan glukokortikoid yang biasanya berupa kortisol, sedangkan untuk zona retikularis akan menghasilkan prekursor androgen yang mayoritas

berupa *Dehydroepiandrosterone* (DHEA) serta androstenedion (Dutt *et al.*, 2021).

Hormon yang dihasilkan oleh korteks adrenal merupakan hormon steroid yang berasal dari prekursor kolesterol. Ketika kolesterol memasuki sel, protein *Steroidogenic Acute Regulatory* (StAR) akan mengatur transpor kolesterol dari membran mitokondria bagian luar ke bagian dalam (Baranowski *et al.*, 2018). Ketika kolesterol berada pada membran mitokondria bagian dalam, kolesterol kemudian diubah menjadi pregnenolon oleh CYP11A1. Zona glomerulosa tidak memiliki 17 alfa-hidroksilase sehingga pregnenolon hanya dapat diubah menjadi progesteron oleh 3-beta-dehidrogenase. Progesteron akan dikonversi oleh 21-hidroksilase menjadi 11-deoksikortikosteron yang selanjutnya diubah menjadi kortikosteron oleh 11-beta-hidroksilase. Kortikosteron kemudian diubah oleh angiotensin II menjadi aldosteron (Dutt *et al.*, 2021).

Zona fasikulata pada korteks adrenal memiliki 17 alfa-hidroksilase sehingga pregnenolon dapat dikonversi menjadi 17-hidroksipregnenolon yang kemudian akan diubah menjadi 17-hidroksiprogesteron oleh 3-beta-dehidrogenase. 17 alfa-hidroksilase juga akan mengubah progesteron yang disintesis pada zona glomerulosa menjadi 17-hidroksiprogesteron. 21-hidroksilase kemudian akan mengubah 17-hidroksiprogesteron menjadi 11-deoksikortisol yang kemudian akan diubah menjadi kortisol yang merupakan glukokortikoid utama oleh 11-beta-hidroksilase. Pada zona retikularis, 17-hidroksipregnenolon dan 17-hidroksiprogesteron akan diubah menjadi DHEA dan androstenedion oleh 17,20 liase (17 alfa-hidroksilase). DHEA kemudian dapat diubah menjadi androstenedion oleh 3 β -hidroksisteroid dehidrogenase (Dutt *et al.*, 2021).



Gambar 2. 5. Jalur Steroidogenik (Sherwood, 2018).

Aksis *Hypothalamic-pituitary-adrenal* (HPA) terlibat dalam proses sekresi glukokortikoid dan androgen yang dihasilkan pada zona fasikulata serta zona retikularis. Sebagai respon terhadap irama sirkadian dan juga stres, neuro preventikular pada hipotalamus akan menyekresikan *Corticotropin Releasing Hormone* (CRH) (Miller, 2018). CRH kemudian akan berikatan dengan reseptor pada hipofisis anterior sehingga menyebabkan terjadinya sintesis *Adrenocorticotropic Hormone* (ACTH) dari *pre-pro-opiomelanocortin* (pre-POMC). ACTH dari hipofisis anterior kemudian bekerja melalui jalur cAMP merangsang korteks adrenal untuk menyekresikan kortisol (Sherwood, 2018).

Berbeda dengan zona fasikulata dan zona retikularis yang melibatkan Aksis *Hypothalamic-pituitary-adrenal* (HPA) dalam proses sekresi hormonnya, proses sekresi hormon pada zona glomerulosa tidak melibatkan aksis *Hypothalamic-pituitary-adrenal* (HPA) melainkan melibatkan *Renin-angiotensin-aldosterone system* (RAAS). Mineralokortikoid merupakan hormon steroid yang dihasilkan oleh zona glomerulosa pada korteks adrenal. Sebagai respon terhadap penurunan

perfusi ginjal yang dirasakan oleh aparatus jukstaglomerulus, ginjal akan menyekresikan renin yang kemudian akan mengubah angiotensinogen menjadi angiotensin I (AT-I). Angiotensin I kemudian akan diubah menjadi angiotensin II (AT-II) oleh *Angiotensin Converting Enzyme* (ACE). Angiotensin II kemudian akan merangsang terjadinya sintesis aldosteron pada zona glomerulosa dengan cara mengaktifkan *aldosterone synthase* (Kline *et al.*, 2017).

Korteks adrenal menghasilkan hormon steroid yang dibagi menjadi tiga kategori yaitu mineralokortikoid, glukokortikoid, dan hormon seks. Mineralokortikoid utama yang disekresikan oleh korteks adrenal adalah aldosteron. Aldosteron bekerja pada bagian tubulus distal dan koligentes ginjal untuk meningkatkan eliminasi K^+ dan meningkatkan reabsorpsi Na^+ pada saat proses pembentukan urin (Sherwood, 2018). Meningkatnya reabsorpsi Na^+ akan menyebabkan terjadinya reabsorpsi H_2O yang kemudian akan menghasilkan peningkatan volume sirkulasi dan menyebabkan terjadi peningkatan tekanan darah (Wagner, 2014). Sekresi aldosteron dipengaruhi oleh beberapa hal yaitu faktor-faktor yang berkaitan dengan penurunan Na^+ dan penurunan darah melalui *Renin-angiotensin-aldosterone system* (RAAS) yang kompleks serta stimulasi peningkatan konsentrasi K^+ plasma (Sherwood, 2018).

Kortisol merupakan hormon glukokortikoid utama yang dihasilkan pada zona fasikulata korteks adrenal. Kortisol berperan dalam mengatur metabolisme karbohidrat, protein, dan lemak serta berperan dalam adaptasi terhadap stres. Efek kortisol terhadap metabolisme secara keseluruhan adalah meningkatkan konsentrasi glukosa darah dengan mengorbankan simpanan lemak dan protein. Kortisol akan merangsang proses glukoneogenesis dalam hati sehingga menyebabkan terjadinya peningkatan jumlah penyimpanan glikogen dalam sel-sel hati dan akan menghambat proses penyerapan serta pemakaian glukosa oleh banyak

jaringan sehingga kadar glukosa dalam darah akan meningkat (Dutt *et al.*, 2021). Kortisol juga berperan dalam proses metabolisme protein serta lemak. Kortisol akan merangsang penguraian protein dengan menguraikannya menjadi asam amino yang nantinya dapat digunakan dalam proses glukoneogenesis. Kortisol juga akan mengaktifasi proses lipolisis yaitu menguraikan lipid yang berada pada jaringan adiposa ke dalam darah. Asam-asam lemak yang dimobilisasi ini kemudian akan digunakan sebagai sumber energi alternatif pengganti glukosa dalam proses metabolik. Kortisol juga dapat membantu dalam proses adaptasi terhadap stres dan juga dapat berperan sebagai anti-inflamasi serta immunosupresif (Sherwood, 2018).

Hormon lain yang disekresikan pada korteks adrenal yaitu androgen. Androgen merupakan hormon steroid yang dihasilkan oleh zona retikularis. Hormon androgen utama yang disekresikan oleh korteks adrenal yaitu *dehydroepiandrosterone* (DHEA) yang kemudian diubah menjadi androstenedion dan selanjutnya diubah menjadi testosteron pada jaringan perifer (Baranowski *et al.*, 2018). Androgen yang dihasilkan oleh adrenal tidak memegang peranan penting pada pria dewasa karena testis adalah sumber utama dari testosteron. Namun, hormon adrenal yang dihasilkan oleh adrenal memiliki peran yang penting pada masa pubertas baik pada perempuan maupun laki-laki dan juga merupakan sumber testosteron utama pada perempuan (Dutt *et al.*, 2021).

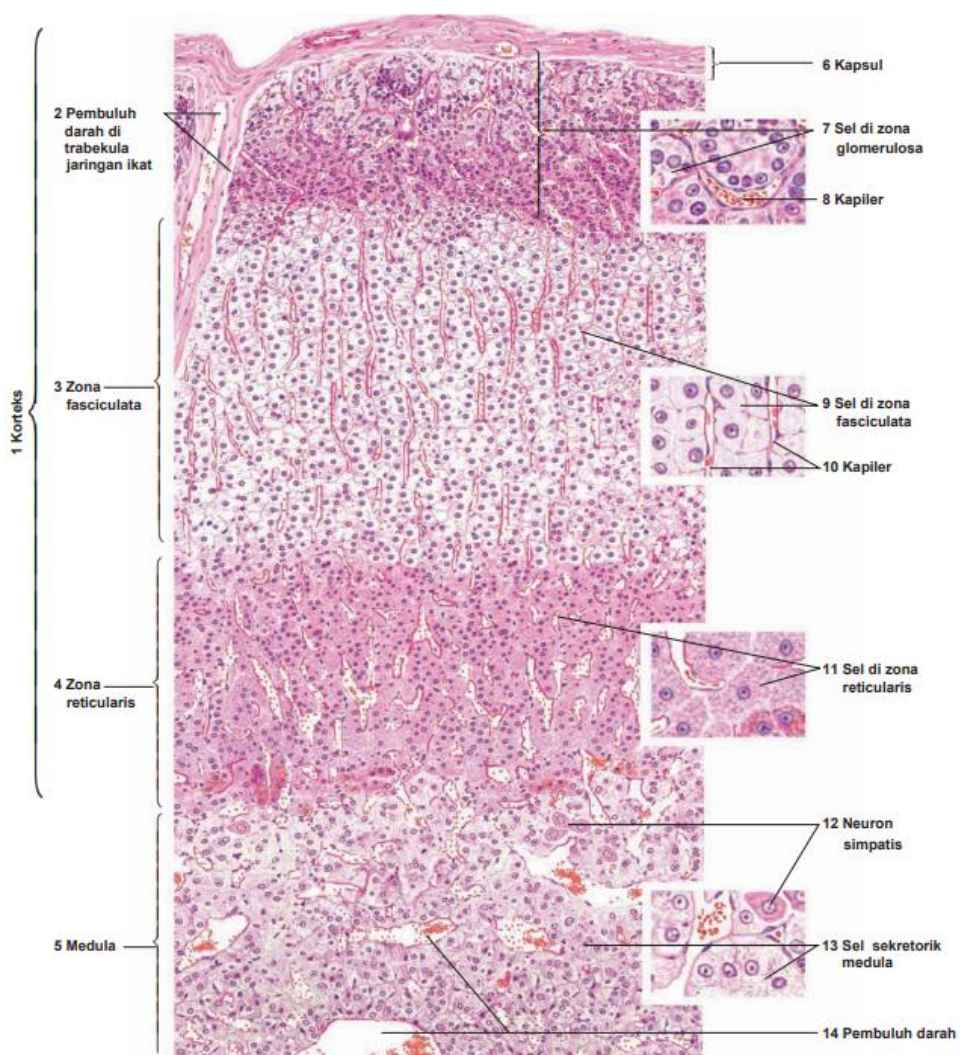
Bagian medula adrenal juga menyekresikan beberapa hormon yang memiliki fungsi penting bagi tubuh. Hormon yang dihasilkan oleh bagian medula adrenal yaitu katekolamin seperti epinefrin, dan norepinefrin. Katekolamin yang dihasilkan oleh medula adrenal merupakan hormon yang terlibat dalam mekanisme *fight-or-flight*. Hormon tersebut akan meningkatkan tekanan darah melalui reseptor alfa-1 pada otot polos pembuluh darah serta membantu meningkatkan kadar glukosa darah

dengan mengaktifkan proses glikogenesis dan meningkatkan sekresi glukagon melalui reseptor beta-2. Hormon ini juga akan mengurangi sekresi insulin melalui reseptor alfa-2 (Paravati & Warrington, 2019).

2.2.3 Histologi Kelenjar Adrenal

Kelenjar adrenal merupakan bagian dari sistem endokrin yang terletak di dekat kutub superior ginjal kanan dan kiri. Masing-masing kelenjar adrenal melekat pada jaringan adiposa di sekitar ginjal dan dibungkus oleh kapsul jaringan ikat padat tidak teratur (Eroschenko, 2012). Secara makroskopis, kelenjar adrenal sebelah kanan berbentuk piramida atau segitiga sedangkan kelenjar adrenal sebelah kiri berbentuk seperti bulan sabit (Erickson, 2014). Kelenjar adrenal memiliki berat dan ukuran yang bervariasi sesuai dengan usia dan keadaan fisiologisnya. Pada orang dewasa, biasanya masing-masing kelenjar adrenal memiliki berat sekitar 4 gram dengan panjang sekitar 4-6 cm, lebar 1-2 cm, dan tebal 4-6 mm (Mescher, 2012).

Kelenjar adrenal terdiri atas dua bagian yaitu korteks pada bagian luar dan medula pada bagian dalam. Bagian korteks adrenal berukuran lebih besar, cenderung lebih tebal dan berwarna lebih kuning dibandingkan dengan bagian medula yang berwarna coklat kemerahan (Megha *et al.*, 2021). Korteks adrenal memiliki gambaran khas sel penyekresi steroid dengan inti sentral serta sitoplasma asidofilik yang biasanya kaya akan droplet lipid. Pada korteks adrenal, bagian sitoplasmanya terlihat mengandung banyak retikulum endoplasma halus dengan tubulus yang saling berhubungan dan mitokondria pada bagian korteks adrenal biasanya berbentuk sferis dengan krista berbentuk tubular (Mescher, 2012).



Gambar 2. 6. Histologi Kelenjar Adrenal (Eroschenko, 2012).

Korteks adrenal memiliki tiga zona konsentris penghasil hormon steroid dengan gambaran histologi yang berbeda yaitu zona glomerulosa, zona fasikulata, dan zona retikularis. Zona glomerulosa merupakan suatu zona tipis yang berada tepat di dalam simpai jaringan ikat yang berfungsi untuk menghasilkan hormon steroid berupa mineralokortikoid dengan produk utama yaitu aldosteron (Eroschenko, 2012). Zona glomerulosa membentuk sekitar 15% dari keseluruhan korteks adrenal dan tersusun atas deretan sel-sel kolumnar atau piramidal yang saling berhimpitan dan membentuk suatu lengkungan yang dikelilingi oleh kapiler. Zona lain pada bagian korteks adrenal yang berada tepat di bagian tengah korteks

adrenal yaitu zona fasikulata. Zona fasikulata merupakan zona pada bagian korteks adrenal yang berfungsi menghasilkan hormon steroid berupa glukokortikoid dengan produk utamanya yaitu kortisol. Zona ini menempati sekitar 65-80% dari keseluruhan korteks adrenal dan terdiri atas deretan panjang setebal satu atau dua sel polihedral panjang yang dipisahkan oleh kapiler sinusoid bertingkat. Zona ini terpulas lebih pucat dibandingkan dengan zona yang lain karena terdiri atas banyak butiran lipid. Zona paling dalam yang berada pada bagian korteks adrenal yaitu zona retikularis. Zona ini terletak berbatasan dengan bagian medula adrenal dan berfungsi menghasilkan hormon seks. Zona retikularis membentuk sekitar 10% dari total keseluruhan korteks adrenal. Zona ini tersusun atas sel kecil yang tersebar di suatu korda iregular dengan kapiler yang lebar dan mengandung lebih sedikit droplet lipid sehingga biasanya terpulas lebih kuat dibandingkan dengan zona yang lain (Mescher, 2012).

Bagian medula adrenal berfungsi untuk menyekresikan katekolamin terutama epinefrin dan norepinefrin. Medula adrenal terpulas pucat dan terdiri atas sel-sel polihedral yang besar serta tersusun atas jalinan serat retikuler. Pada bagian medula adrenal terdapat sel kromafin yang memiliki banyak granula padat elektron yang berdiameter sekitar 150-350 nm. Granula-granula ini berfungsi untuk menyekresi dan menyimpan hormon. Granula-granula ini mengandung salah satu dari dua katekolamin yaitu epinefrin dan norepinefrin. Granula penyekresi epinefrin berukuran lebih kecil dan kurang bersifat padat-elektron dibandingkan dengan granula penyekresi norepinefrin (Mescher, 2012).

2.3 Pengaruh Kopi Terhadap Kelenjar Adrenal

Kopi merupakan salah satu minuman yang sering dikonsumsi masyarakat dengan tujuan untuk menghilangkan stres. Kopi dapat berfungsi menurunkan stres apabila dikonsumsi dalam jumlah yang tepat, akan tetapi apabila kopi

dikonsumsi secara berlebih maka akan memicu terjadinya stres pada seseorang dan menyebabkan terjadinya peningkatan sekresi hormon kortisol serta epinefrin (Flueck *et al.*, 2016; Ryu & Roh, 2019). Kortisol dan epinefrin merupakan suatu hormon yang disekresikan oleh kelenjar adrenal dan memegang peranan penting dalam mekanisme adaptasi terhadap stres (Thau *et al.*, 2021).

Stres merupakan salah satu rangsangan utama peningkatan sekresi kortisol. Stresor akan merangsang hipotalamus untuk menghasilkan *Corticotropin Releasing Hormone* (CRH). CRH kemudian akan merangsang hipofisis anterior untuk mengeluarkan *Adrenocorticotrophic Hormone* (ACTH) yang nantinya merangsang korteks adrenal untuk menyekresikan kortisol. Stresor juga akan merangsang hipotalamus mengirimkan sinyal melalui saraf otonom ke bagian medula kelenjar adrenal untuk menyekresikan hormon epinefrin ke dalam aliran darah (Sherwood, 2018).

Pemberian kafein dosis tinggi dapat menginduksi terjadinya gangguan pada pembentukan aksis *Hypothalamic-pituitary-adrenal* (HPA) sehingga akan menyebabkan terjadinya respon stres yang abnormal (Ryu & Roh, 2019). Respon stres yang abnormal dapat bermanifestasi pada bagian korteks dan medula adrenal. Salah satu indikator umum stres pada studi eksperimental dan toksisitas adalah terjadinya peningkatan berat kelenjar adrenal. Respon awal korteks adrenal terhadap stres adalah hipertrofi pada korteks adrenal. Jika stres terjadi berkepanjangan, maka akan terjadi hiperplasia pada korteks adrenal. Hipertrofi pada korteks adrenal terjadi karena adanya peningkatan sekresi dari *Adrenocorticotrophic Hormone* (ACTH) sehingga menyebabkan zona fasikulata bekerja secara berlebihan untuk menyekresikan kortisol. Respon medula adrenal terhadap stres akut adalah terjadinya pembesaran medula adrenal akibat peningkatan sekresi epinefrin dan degranulasi sel kromafin, sedangkan respon medula adrenal terhadap stres kronis adalah terjadinya

peningkatan proliferasi sel kromafin, dan peningkatan frekuensi feokromositoma (Everds *et al.*, 2013).

2.4 Uji Toksisitas

2.4.1 Definisi

Uji toksisitas merupakan suatu percobaan yang dilakukan untuk menilai efek toksik dari suatu senyawa pada bahan atau sediaan uji tertentu dan juga untuk memperoleh data terkait dosis-respon yang khas dari sediaan uji. Data tersebut nantinya dapat digunakan untuk memberikan informasi mengenai derajat bahaya sediaan uji tersebut bila terjadi paparan pada manusia sehingga dapat ditentukan dosis aman penggunaannya. Uji toksisitas biasanya dilakukan secara *in vivo*, menggunakan hewan coba dan dapat digunakan untuk melihat ada tidaknya reaksi fisiologis, biokimia serta patologis dari suatu sediaan uji terhadap manusia. Hasil dari uji toksisitas yang telah dilakukan dapat digunakan untuk memberikan petunjuk mengenai ada tidaknya toksisitas relatif dan juga dapat membantu mengidentifikasi efek toksik yang mungkin terjadi bila terjadi paparan bahan uji pada manusia. Hasil uji toksisitas ini tidak dapat digunakan secara mutlak untuk membuktikan keamanan dari suatu bahan atau sediaan uji pada manusia (BPOM, 2014).

2.4.2 Uji Toksisitas Akut Oral

Uji toksisitas akut oral merupakan suatu uji yang dilakukan untuk melihat efek toksik dari suatu sediaan uji yang muncul dalam waktu 24 jam setelah diberikan secara oral baik dalam dosis tunggal maupun dosis berulang. Uji toksisitas akut oral bertujuan untuk melihat adanya toksisitas intrinsik dari suatu zat, kepekaan spesies, menentukan organ sasaran, mendapatkan informasi mengenai bahaya setelah pemaparan suatu zat secara akut, mendapatkan informasi awal yang dapat digunakan untuk menetapkan tingkat dosis, memperoleh nilai LD₅₀ dari suatu

sediaan, merancang uji toksisitas selanjutnya dan menentukan pengelompokan sediaan atau bahan dan pelabelan (BPOM, 2014).

Prinsip dari uji toksisitas akut oral yaitu, beberapa tingkatan dosis dari sediaan uji akan diberikan pada beberapa kelompok hewan coba dan tiap kelompok akan mendapatkan satu dosis sediaan uji. Setelah diberikan sediaan uji, dilakukan pengamatan pada setiap kelompok untuk melihat ada tidaknya efek toksik dan juga kematian pada hewan coba. Hewan coba yang menunjukkan tanda-tanda seperti sakit, merasakan nyeri, dan distress akan dikorbankan lebih dini dan dianggap sebagai hewan yang mati akibat pemberian sediaan uji tersebut. Hewan coba yang mati saat proses uji toksisitas berlangsung maupun hewan coba yang tetap hidup sampai akhir proses uji toksisitas akan diterminasi untuk dinilai ada tidaknya gejala toksisitas dan ada tidaknya kerusakan pada organ secara histopatologi setelah diberikan sediaan uji (BPOM, 2014).

2.4.3 Metode Uji OECD *Guideline* No. 423

Metode *Organization for Economic Cooperation and Development* (OECD) merupakan salah satu metode yang dapat digunakan sebagai *guideline* dalam melakukan uji toksisitas akut oral (OECD, 2001). Metode ini sudah disesuaikan dengan kriteria toksisitas berdasarkan *Global Harmonized System* (GHS) sehingga metode OECD ini sudah diakui secara internasional. Metode OECD terdiri atas beberapa versi berbeda, yaitu OECD 401 *Acute Oral Toxicity* (AOT), OECD 420 *Fixed Dose Procedure* (FDP), OECD 423 *Acute Toxic Class Method* (ATC), dan OECD 425 *Up-and-Down Procedure* (UDP). Pemilihan versi OECD yang akan digunakan sebagai *guideline* uji dapat disesuaikan dengan kebutuhan dan juga kepentingan penelitian (Sunggono *et al.*, 2014).

Metode OECD No. 423 merupakan pembaruan dari OECD No. 401 sehingga metode ini dapat digunakan sebagai metode alternatif untuk *guideline* uji toksisitas akut oral menggantikan metode OECD No. 401. Tujuan digunakannya metode ini sebagai *guideline* dalam melakukan uji toksisitas akut oral yaitu karena metode ini dapat menentukan dosis toksik dari suatu senyawa dan juga dapat menentukan kisaran nilai LD₅₀ (*Lethal Dose 50*) dari suatu senyawa. LD₅₀ ini dapat digunakan untuk menggolongkan bahan atau senyawa dari mulai yang bersifat super toksik sampai yang tidak toksik. Penentuan tingkat toksisitas akut dari suatu sediaan uji berdasarkan nilai LD₅₀ dapat digolongkan berdasarkan klasifikasi seperti pada tabel 2.3 (Hodge & Sterner, 2005).

Tabel 2. 3. Kriteria Penggolongan Toksisitas Akut Berdasarkan LD₅₀

Tingkat Toksisitas	LD ₅₀ oral (pada tikus)	Klasifikasi
1	≤ 5 mg/kg	Super Toksik
2	5-50 mg	Sangat Toksik
3	>50 – 500 mg	Toksik
4	>500-2000 mg	Toksik Sedang
5	>2000-5000 mg	Toksik Ringan
6	>5000 mg	Tidak Toksik

(Hodge & Sterner, 2005).

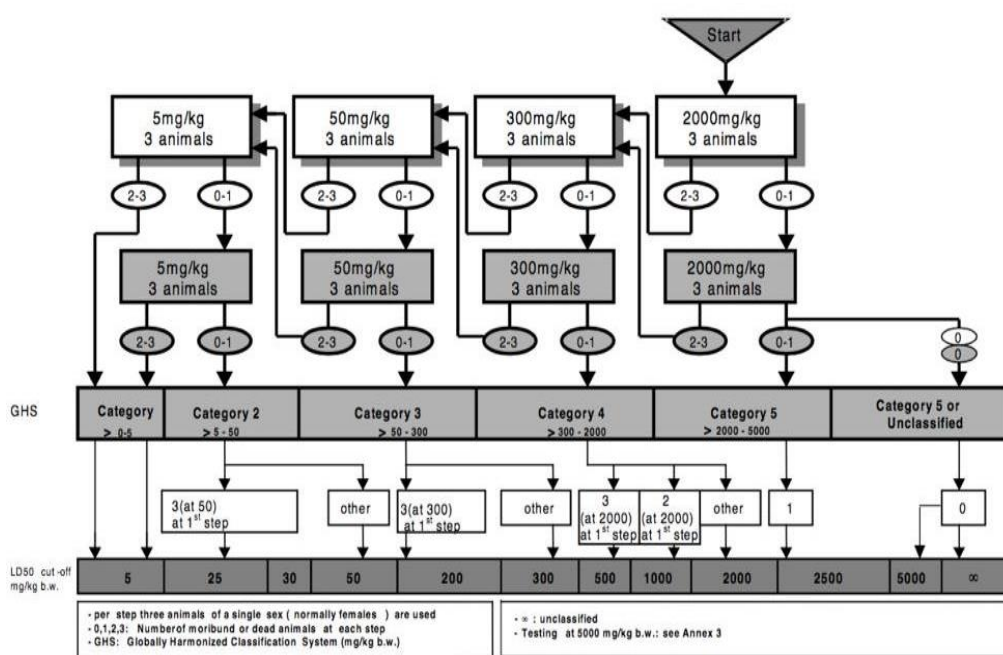
Kriteria penggolongan toksisitas akut seperti pada tabel 2.3 biasanya digunakan untuk menentukan kategori toksisitas akut untuk obat, obat tradisional, suplemen kesehatan, dan bahan lainnya (*Generally Recognized as Safe/GRAS*) seperti bahan pangan. Penentuan kategori toksisitas akut bahan kimia seperti pestisida serta untuk pelabelannya akan dievaluasi berdasarkan kriteria bahaya dari GHS (*Globally Harmonized Classification System for Chemical Substances and Mixtures*) yang tercantum dalam OECD *guidelines for The Testing of Chemicals* (2001) seperti pada tabel 2.4 (BPOM, 2014).

Tabel 2. 4. Kriteria Penggolongan Sediaan Uji Menurut OECD

Dosis (mg/kgBB)	Kematian	Kategori
5	≥ 2 dari 5 ekor mati	1
5	≥ 1 ekor menunjukkan gejala toksisitas dan tidak ada kematian	2
50	≥ 2 dari 5 ekor mati	
50	≥ 1 ekor menunjukkan gejala toksisitas dan tidak ada kematian	3
300	≥ 2 dari 5 ekor mati	
300	≥ 1 ekor dengan gejala toksisitas dan atau <1 mati	4
2000	≥ 2 dari 5 ekor mati	
2000	≥ 1 ekor dengan gejala toksisitas dan atau tidak ada kematian	5
	Tidak ada gejala toksisitas	5/ <i>unclassified</i>

(OECD, 2001)

Prinsip dari metode OECD No. 423 yaitu prosedur uji toksisitas akut oral akan dilakukan dengan prosedur bertahap dengan masing-masing kelompok uji terdiri atas 3 hewan coba dengan jenis kelamin yang sama. Sediaan uji akan diberikan secara bertahap dengan dosis pemberian yaitu 5, 50, 300, dan 2000 mg/kgBB dalam satu kali pemberian atau *single dose* dan satu kelompok hewan coba hanya akan diberikan satu dosis sediaan uji secara oral. Pengecualian dan hanya jika dibenarkan oleh kebutuhan, penggunaan tingkat dosis tambahan yaitu 5000 mg/kgBB dapat dipertimbangkan. Pada uji toksisitas akut oral akan dilakukan *limit test* menggunakan dosis 2000 mg/kgBB. *Limit test* dilakukan apabila peneliti telah memiliki informasi yang menyatakan bahwa sediaan uji tidak bersifat toksik atau hanya bersifat toksik apabila melebihi batas dosis yang telah ditentukan sehingga penelitian dimulai dengan pemberian sediaan uji pada hewan coba dari dosis yang tertinggi yaitu 2000 mg/kgBB (OECD, 2001). Tahapan uji toksisitas akut dengan menggunakan metode OECD No. 423 secara lebih jelas dapat dilihat pada gambar 2.7 (OECD, 2001).



Gambar 2. 7. Prosedur Uji Toksisitas Akut Berdasarkan OECD No. 423 (OECD, 2001).

2.5 Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Galur Sprague-Dawley

Tikus merupakan salah satu hewan coba yang sering digunakan dalam berbagai macam penelitian medis. Tikus banyak digunakan dalam penelitian dikarenakan tikus memiliki fungsi organ yang sama dengan manusia, memiliki karakteristik genetik yang unik, murah, mudah berkembang biak, dan mudah untuk didapatkan. Secara morfologi, tikus putih memiliki ciri-ciri yaitu kepala berukuran kecil dan ekor yang lebih panjang dibandingkan dengan badannya, pertumbuhannya cepat, dan cukup tahan terhadap perlakuan (Adiyati, 2011).

Tikus putih (*Rattus norvegicus*) atau yang dikenal juga dengan nama *Norway Rat* terdiri atas beberapa galur yang berasal dari 15 persilangan. Galur Wistar, Sprague-Dawley, Long Evans, dan Holtzman merupakan beberapa galur dari tikus yang sering digunakan dalam penelitian (Adiyati, 2011). Tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur Sprague-Dawley merupakan galur yang dikembangkan dari galur Wistar. Rata-rata ukuran induk tikus galur ini yaitu

sekitar 250-300 gram untuk betina dan 450-520 gram untuk jantan. Tikus putih galur ini memiliki pertumbuhan yang cepat yaitu dapat bertambah berat badannya mencapai 400 gram selama 12 minggu dan umumnya memiliki waktu rentan kehidupan sekitar 2,5-3,5 tahun (Suckow *et al.*, 2006).

Menurut Myers & Armitage (2004), klasifikasi tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur Sprague-Dawley adalah sebagai berikut :

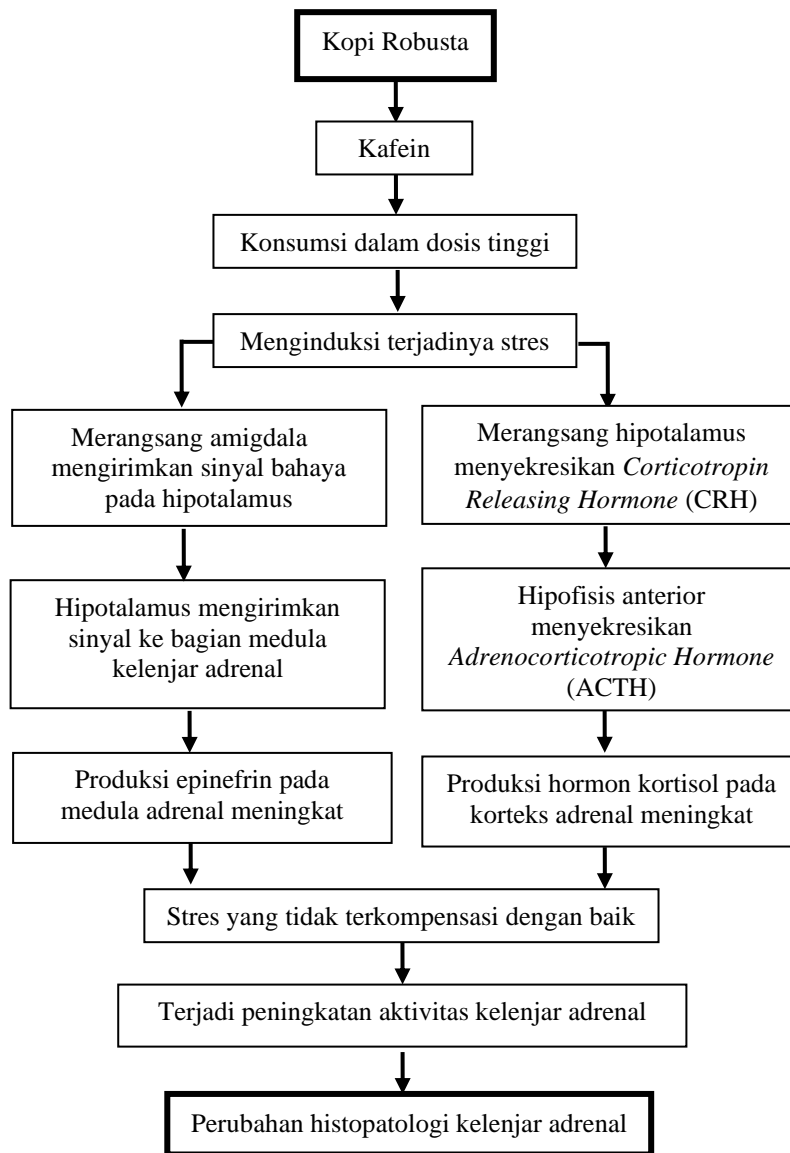
Kingdom	: Animalia
Filum	: Chordata
Subfilum	: Vertebrata
Kelas	: Mammalia
Ordo	: Rodentia
Famili	: Muridae
Genus	: Rattus
Spesies	: <i>Rattus norvegicus</i>



Gambar 2. 8. Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Galur Sprague-Dawley (Palembang Tikus Center, 2016).

2.6 Kerangka Penelitian

2.6.1 Kerangka Teori



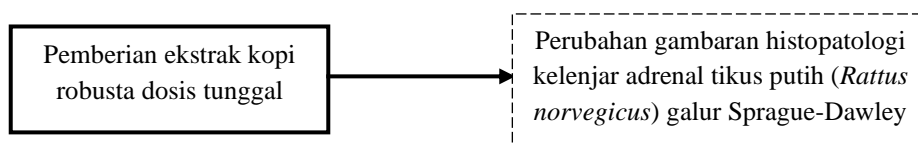
Gambar 2. 9. Kerangka Teori

Keterangan :

: Variabel yang diteliti

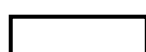
: Variabel yang tidak diteliti

2.6.2 Kerangka Konsep

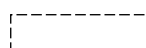


Gambar 2. 10. Kerangka Konsep

Keterangan :



: Variabel independen



: Variabel dependen

2.7 Hipotesis

H₀ : Tidak terdapat pengaruh uji toksisitas akut dosis tunggal ekstrak kopi robusta (*Coffea canephora*) terhadap gambaran histopatologi kelenjar adrenal tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur Sprague-Dawley menggunakan *guideline* uji OECD No. 423.

H_a : Terdapat pengaruh uji toksisitas akut dosis tunggal ekstrak kopi robusta (*Coffea canephora*) terhadap gambaran histopatologi kelenjar adrenal tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur Sprague-Dawley menggunakan *guideline* uji OECD No. 423.

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Desain Penelitian

Jenis penelitian ini merupakan penelitian *quasi experimental* dengan rancangan penelitian *post-test only control group design*, yaitu pengambilan data diambil setelah dilakukan perlakuan dan dibandingkan antara kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan (Notoatmodjo, 2010). Sebanyak 18 ekor tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan galur Sprague-Dawley berusia 8-12 minggu dipilih secara acak (*random sampling*) dan dibagi ke dalam 6 kelompok, yaitu 1 kelompok kontrol dan 5 kelompok perlakuan.

3.2 Tempat dan Waktu Penelitian

3.2.1 Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Fakultas Kedokteran Universitas Lampung. Proses aklimatisasi, intervensi dan terminasi tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan galur Sprague-Dawley dilakukan di *Animal House* Fakultas Kedokteran Universitas Lampung. Proses pembuatan dan pengamatan preparat dilakukan di Laboratorium Histologi dan Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Lampung. Pembuatan ekstrak biji kopi robusta (*Coffea canephora*) dilakukan di Laboratorium Kimia Organik Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung.

3.2.2 Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan dari bulan November 2021 sampai dengan bulan Maret 2022.

3.3 Subjek Penelitian

3.3.1 Populasi Penelitian

Populasi penelitian yang digunakan pada penelitian ini adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan galur Sprague-Dawley berusia 8-12 minggu dengan berat sekitar 200-300 gram yang diperoleh dari Palembang Tikus Center.

3.3.2 Sampel Penelitian

Sampel penelitian yang digunakan pada penelitian ini adalah 18 ekor tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan galur Sprague-Dawley yang dibagi ke dalam 6 kelompok secara acak (*random sampling*), yaitu 1 kelompok kontrol dan 5 kelompok perlakuan sehingga masing-masing kelompok terdiri atas 3 ekor tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan galur Sprague-Dawley. Penentuan jumlah sampel penelitian ini telah diatur dalam *guideline uji OECD No.423 Acute Oral Toxicity Class Method*.

3.3.3 Kriteria Inklusi

Kriteria inklusi sampel penelitian ini adalah :

- 1) Tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan galur Sprague-Dawley.
- 2) Sehat (bergerak secara aktif, rambut tidak rontok dan tidak kusam).
- 3) Memiliki berat badan antara 200-300 gram.
- 4) Berusia sekitar 8-12 minggu.

3.3.4 Kriteria Eksklusi

Kriteria eksklusi sampel penelitian ini adalah :

- 1) Terdapat kelainan anatomis pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan galur Sprague-Dawley.
- 2) Terdapat penurunan berat badan lebih dari 10% setelah masa adaptasi.

3.3.5 Kelompok Perlakuan

Tabel 3. 1. Kelompok Perlakuan

No	Kelompok	Perlakuan
1	Kelompok Kontrol (K)	Kelompok tikus diberi larutan Na-CMC 1% dengan volume 2,5 ml per oral.
2	Kelompok Perlakuan 1 (P1)	Kelompok tikus diberi ekstrak kopi robusta (<i>Coffea canephora</i>) dengan dosis 2000 mg/kgBB dan volume pemberian 2,5 ml per oral dalam satu kali pemberian.
3	Kelompok Perlakuan 2 (P2)	Kelompok tikus diberi ekstrak kopi robusta (<i>Coffea canephora</i>) dengan dosis 300 mg/kgBB dan volume pemberian 2,5 ml per oral dalam satu kali pemberian.
4	Kelompok Perlakuan 3 (P3)	Kelompok tikus diberi ekstrak kopi robusta (<i>Coffea canephora</i>) dengan dosis 50 mg/kgBB dan volume pemberian 2,5 ml per oral dalam satu kali pemberian.
5	Kelompok Perlakuan 4 (P4)	Kelompok tikus diberi ekstrak kopi robusta (<i>Coffea canephora</i>) dengan dosis 5 mg/kgBB dan volume pemberian 2,5 ml per oral dalam satu kali pemberian.
6	Kelompok Perlakuan 5 (P5)* *dilakukan apabila terdapat 0-1 kematian pada P1	Kelompok tikus diberi ekstrak kopi robusta (<i>Coffea canephora</i>) dengan dosis 5000 mg/kgBB dan volume pemberian 2,5 ml per oral dalam satu kali pemberian.

3.4 Identifikasi Variabel Penelitian

3.4.1 Variabel Bebas

Variabel bebas dari penelitian ini adalah pemberian ekstrak kopi robusta (*Coffea canephora*) Lampung.

3.4.2 Variabel Terikat

Variabel terikat dari penelitian ini adalah gambaran histopatologi kelenjar adrenal tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur Sprague-Dawley.

3.5 Definisi Operasional

Tabel 3. 2. Definisi Operasional

Variabel	Definisi	Alat Ukur	Hasil Ukur	Skala
Ekstrak kopi robusta (<i>Coffea canephora</i>) Lampung	Ekstrak kopi robusta (<i>Coffea canephora</i>) Lampung yang dibuat dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol 96%.	S spuit 3 cc, tabung ukur dan neraca analitik.	Menurut OECD (2001) : P1 = 2000 mg/kgBB P2 = 300 mg/kgBB P3 = 50 mg/kgBB P4 = 5 mg/kgBB P5 = 5000 mg/kgBB	Kategorik Nominal
Gambaran histopatologi kelenjar adrenal				
1) Luas area medula adrenal	Luas area medula adrenal dinilai dengan menggunakan mikroskop cahaya perbesaran 4x dan <i>software ImageJ</i> (Ryu & Roh, 2019).	Mikroskop cahaya, <i>Software ImageJ</i>	mm ²	Numerik Rasio
2) Ketebalan korteks adrenal	Ketebalan dari korteks adrenal dinilai dengan mengukur diameter terbesar dari korteks adrenal menggunakan mikroskop cahaya perbesaran 4x dan <i>software Olympus stream J</i> (Aguila et al., 2018; Ryu & Roh, 2019).	Mikroskop cahaya <i>software Olympus stream J</i>	µm	Numerik Rasio

3.6 Instrumen Penelitian

3.6.1 Alat Penelitian

- 1) Alat selama perlakuan :
 - a. Kandang tikus yang terbuat dari bahan plastik berukuran 39x42x15 cm³ dan tutup yang terbuat dari kawat serta kayu.
 - b. Tempat makan dan botol minum tikus
 - c. Sonde lambung

- d. Sduit oral 1 cc, 3 cc, dan 5 cc
 - e. Pipet tetes
 - f. Gelas ukur 10 ml dan 100 ml
 - g. Labu ukur 100 ml dan 250 ml
 - h. Neraca analitik
 - i. Tabung erlenmeyer
 - j. Maserator dan *Rotary evaporator*
 - k. *Vacuum filtration*
 - l. *Handscoon*
 - m. Masker
 - n. Pengaduk
- 2) Alat selama pembuatan preparat histologi
- a. Minor set
 - b. *Tissue cassette*
 - c. *Automatic tissue processor*
 - d. Kertas saring
 - e. *Paraffin dispenser*
 - f. Histoplast
 - g. *Base mold*
 - h. *Rotary microtome*
 - i. *Waterbath*
 - j. *Staining jar*
 - k. *Staining jack*
 - l. *Cover glass*
 - m. *Object glass*
 - n. Mikroskop cahaya

3.6.2 Bahan Penelitian

- 1) Bahan selama perlakuan :
- a. Tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur Sprague-Dawley
 - b. Pakan tikus

- c. Aquadest
 - d. Sekam
 - e. Ekstrak kopi robusta (*Coffea canephora*)
 - f. Etanol 96%
 - g. Na-CMC 1%
- 2) Bahan untuk membuat preparat histologi :
- a. Formalin 10%
 - b. Alkohol bertingkat (70%-80%-96%-100%)
 - c. Alkohol absolut
 - d. Xylol
 - e. Pewarna hematoksilin-eosin
 - f. Entelan

3.7 Prosedur Penelitian

3.7.1 Aklimatisasi Hewan Coba

Aklimatisasi hewan coba dilakukan di *Animal House* Fakultas Kedokteran Universitas Lampung selama 7 hari. Hewan coba ditimbang beratnya saat pertama kali datang dan dilakukan penandaan untuk menentukan pembagian kelompok perlakuan, 1 kelompok perlakuan terdiri atas 3 ekor tikus putih. Hewan coba kemudian ditempatkan pada kandang yang terbuat dari bahan plastik dan tutup berupa kawat besi yang dikelilingi kayu sehingga lebih kokoh dengan dasar kandang diisi sekam dengan ketebalan sekitar 0.5-1 cm (Agustina, 2017).

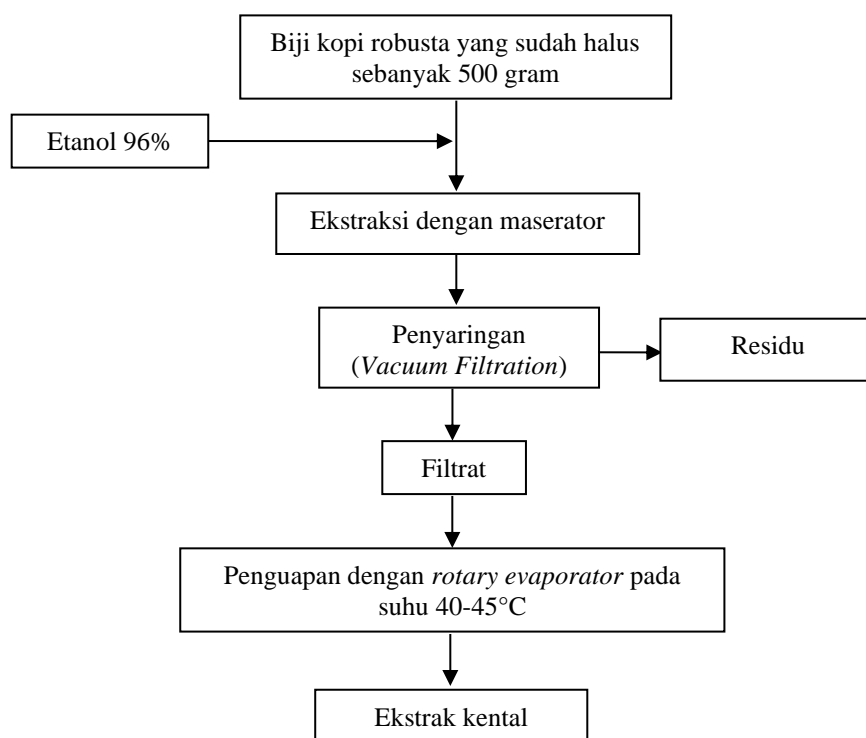
Hewan coba dipelihara pada ruangan dengan suhu, kelembaban dan pengaturan cahaya yang sesuai. Setiap harinya, hewan coba diberi makan berupa pakan tikus standar dan minum berupa aquadest yang diletakkan dalam botol plastik secara *ad libitum*. Aktivitas motorik dari hewan coba juga selalu diamati setiap harinya. Kebersihan dari kandang juga selalu

dijaga dengan cara dilakukan penggantian sekam setiap 2 hari sekali (Agustina, 2017).

3.7.2 Proses Penyangraian Kopi

Proses penyangraian kopi dilakukan menggunakan alat bernama *hot air roaster*. Proses penyangraian diawali dengan proses penimbangan biji kopi terlebih dahulu. Pada penelitian ini, derajat penyangraian biji kopi yang dibutuhkan yaitu *light roast* sehingga proses penyangraian dilakukan dengan metode *high temperature short time*. Untuk mendapatkan kopi dengan tingkat penyangraian *light roast*, maka biji kopi disangrai menggunakan *hot air roaster* dengan suhu mencapai 180-195°C selama 5-10 menit sampai terjadi *first cracks* dan terjadi perubahan warna pada biji kopi menjadi *light brown* (Fadri *et al.*, 2019).

3.7.3 Pembuatan dan Perhitungan Dosis Ekstrak Kopi Robusta



Gambar 3. 1. Prosedur Ekstraksi Kopi Menggunakan Metode Maserasi

Biji kopi robusta (*Coffea canephora*) yang sudah disangrai kemudian dihaluskan menjadi serpihan-serpihan kecil. Biji kopi yang sudah halus kemudian ditimbang sebanyak 500 gram menggunakan neraca dan dilakukan ekstraksi dengan metode maserasi dalam larutan etanol 96% selama 24 jam dengan menggunakan maserator. Setelah itu, dilakukan penyaringan dengan pompa vakum sehingga dihasilkan filtrat dan residu. Filtrat yang dihasilkan kemudian diuapkan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 40-45°C sehingga dihasilkan ekstrak pekat dengan konsentrasi 100% (Yaqin & Nurmilawati, 2015).

Perhitungan penimbangan bahan pembuatan larutan uji dan volume pemberian :

1) Larutan Na-CMC 1%

Larutan stok dibuat sebanyak 150 ml, maka Na-CMC yang ditimbang adalah

$$\frac{1 \text{ gr}}{100 \text{ ml}} \times 150 \text{ ml} = 1,5 \text{ gram}$$

Sebanyak 1,5 gram Na-CMC dilarutkan menggunakan aquades hingga 150 ml.

2) Pembuatan kadar suspensi stok ekstrak biji kopi robusta dengan dosis 2000 mg/kgBB

Rata-rata berat badan tikus = 250 gram

a. Dosis ekstrak biji kopi robusta = 2000 mg/kgBB

$$\frac{2000 \text{ mg}}{1000 \text{ grBB}} \times 250 \text{ grBB} = 500 \text{ mg}$$

b. Kadar larutan stok ekstrak biji kopi robusta dengan dosis 2000 mg/kgBB dengan volume pemberian per oral 2,5 ml

$$\frac{500 \text{ mg}}{2,5 \text{ ml}} = 200 \text{ mg/ml}$$

c. Pembuatan larutan stok sebanyak 25 ml, ekstrak biji kopi robusta yang ditimbang adalah

$$\frac{200 \text{ mg}}{1 \text{ ml}} \times 25 \text{ ml} = 5000 \text{ mg} = 5 \text{ gram}$$

Sebanyak 5 gram ekstrak biji kopi robusta disuspensikan dengan Na-CMC 1% hingga 25 ml.

- 3) Pembuatan kadar suspensi stok ekstrak biji kopi robusta dengan dosis 300 mg/kgBB

Rata-rata berat badan tikus = 250 gram

- a. Dosis ekstrak biji kopi robusta = 300 mg/kgBB

$$\frac{300 \text{ mg}}{1000 \text{ grBB}} \times 250 \text{ grBB} = 75 \text{ mg}$$

- b. Kadar larutan stok ekstrak biji kopi robusta dengan dosis 300 mg/kgBB dengan volume pemberian per oral 2,5 ml

$$\frac{75 \text{ mg}}{2,5 \text{ ml}} = 30 \text{ mg/ml}$$

- c. Pembuatan larutan stok sebanyak 25 ml, ekstrak biji kopi robusta yang ditimbang adalah

$$\frac{30 \text{ mg}}{1 \text{ ml}} \times 25 \text{ ml} = 750 \text{ mg} = 0,75 \text{ gram}$$

Sebanyak 0,75 gram ekstrak biji kopi robusta disuspensikan dengan Na-CMC 1% hingga 25 ml.

- 4) Pembuatan kadar suspensi stok ekstrak biji kopi robusta dengan dosis 50 mg/kgBB

Rata-rata berat badan tikus = 250 gram

- a. Dosis ekstrak biji kopi robusta = 50 mg/kgBB

$$\frac{50 \text{ mg}}{1000 \text{ grBB}} \times 250 \text{ grBB} = 12,5 \text{ mg}$$

- b. Kadar larutan stok ekstrak biji kopi robusta dengan dosis 50 mg/kgBB dengan volume pemberian per oral 2,5 ml

$$\frac{12,5 \text{ mg}}{2,5 \text{ ml}} = 5 \text{ mg/ml}$$

- c. Pembuatan larutan stok sebanyak 25 ml, ekstrak biji kopi robusta yang ditimbang adalah

$$\frac{5 \text{ mg}}{1 \text{ ml}} \times 25 \text{ ml} = 125 \text{ mg} = 0,125 \text{ gram}$$

Sebanyak 0,125 gram ekstrak biji kopi robusta disuspensikan dengan Na-CMC 1% hingga 25 ml.

5) Pembuatan kadar suspensi stok ekstrak biji kopi robusta dengan dosis 5 mg/kgBB

Rata-rata berat badan tikus = 250 gram

a. Dosis ekstrak biji kopi robusta = 5 mg/kgBB

$$\frac{5 \text{ mg}}{1000 \text{ grBB}} \times 250 \text{ grBB} = 1,25 \text{ mg}$$

b. Kadar larutan stok ekstrak biji kopi robusta dengan dosis 5 mg/kgBB dengan volume pemberian per oral 2,5 ml

$$\frac{1,25 \text{ mg}}{2,5 \text{ ml}} = 0,5 \text{ mg/ml}$$

c. Pembuatan larutan stok sebanyak 25 ml, ekstrak biji kopi robusta yang ditimbang adalah

$$\frac{0,5 \text{ mg}}{1 \text{ ml}} \times 25 \text{ ml} = 12,5 \text{ mg} = 0,0125 \text{ gram}$$

Sebanyak 0,0125 gram ekstrak biji kopi robusta disuspensikan dengan Na-CMC 1% hingga 25 ml.

6) Pembuatan kadar suspensi stok ekstrak biji kopi robusta dengan dosis 5000 mg/kgBB

Rata-rata berat badan tikus = 250 gram

a. Dosis ekstrak biji kopi robusta = 5000 mg/kgBB

$$\frac{5000 \text{ mg}}{1000 \text{ grBB}} \times 250 \text{ grBB} = 1250 \text{ mg}$$

b. Kadar larutan stok ekstrak biji kopi robusta dengan dosis 5000 mg/kgBB dengan volume pemberian per oral 2,5 ml

$$\frac{1250 \text{ mg}}{2,5 \text{ ml}} = 500 \text{ mg/ml}$$

c. Pembuatan larutan stok sebanyak 25 ml, ekstrak biji kopi robusta yang ditimbang adalah

$$\frac{500 \text{ mg}}{1 \text{ ml}} \times 25 \text{ ml} = 12500 \text{ mg} = 12,5 \text{ gram}$$

Sebanyak 12,5 gram ekstrak biji kopi robusta disuspensikan dengan Na-CMC 1% hingga 25 ml.

Berdasarkan perhitungan tersebut, maka jumlah ekstrak biji kopi robusta (*Coffea canephora*) yang dibutuhkan pada penelitian ini adalah sebanyak 18,3875 gram.

3.7.4 Intervensi Hewan Coba

Sebanyak 18 ekor tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan galur Sprague-Dawley dikelompokkan ke dalam 1 kelompok kontrol dan 5 kelompok perlakuan. Pada kelompok kontrol, tikus putih hanya diberi larutan Na-CMC 1% sebanyak 2,5 ml per oral. Kemudian untuk kelompok perlakuan 1, tikus putih diberikan ekstrak kopi robusta (*Coffea canephora*) dengan dosis 2000 mg/kgBB sebanyak 2,5 ml per oral. Pada kelompok perlakuan 2, tikus putih diberikan ekstrak kopi robusta (*Coffea canephora*) dengan dosis 300 mg/kgBB sebanyak 2,5 ml per oral. Pada kelompok perlakuan 3, tikus putih diberikan ekstrak kopi robusta (*Coffea canephora*) dengan dosis 50 mg/kgBB sebanyak 2,5 ml per oral. Pada kelompok perlakuan 4, tikus putih diberikan ekstrak kopi robusta (*Coffea canephora*) dengan dosis 5 mg/kgBB sebanyak 2,5 ml per oral dan pada kelompok perlakuan 5, tikus putih diberikan ekstrak kopi robusta (*Coffea canephora*) dengan dosis 5000 mg/kgBB sebanyak 2,5 ml per oral (OECD, 2001).

Proses intervensi dilakukan secara bertahap dan dosis yang diberikan merupakan dosis tunggal (*single dose*). Proses intervensi dimulai dari kelompok perlakuan 1 yaitu dengan dosis 2000 mg/kgBB. Setelah diberi perlakuan, kelompok perlakuan 1 diamati secara intensif pada 30 menit pertama, dilanjutkan 4 jam kemudian, 8 jam kemudian, dan 24 jam kemudian. Apabila selama pengamatan tidak ditemukan adanya hewan coba yang mati atau hanya terdapat satu hewan coba yang mati, maka dilakukan pemberian ekstrak biji kopi robusta dengan dosis 5000 mg/kgBB pada kelompok perlakuan 5. Akan tetapi, apabila pada saat setelah diberikan kopi robusta dengan dosis 2000 mg/kgBB ditemukan terdapat 2-3 hewan coba yang mati maka dilakukan pemberian kopi

robusta dengan dosis 300 mg/kgBB pada kelompok perlakuan 2. Setelah kelompok perlakuan 2 diberi kopi robusta dengan dosis 300 mg/kgBB, kelompok perlakuan 2 diamati kembali seperti pada kelompok perlakuan 1. Apabila setelah pengamatan terdapat 2-3 hewan coba yang mati maka dilakukan proses pemberian kopi robusta dengan dosis 50 mg/kgBB pada kelompok perlakuan 3. Setelah itu, kelompok perlakuan 3 diamati secara intensif seperti pada kelompok perlakuan 1 dan 2. Apabila terdapat 2-3 hewan coba yang mati maka dilakukan proses pemberian kopi robusta dengan dosis 5 mg/kgBB pada kelompok perlakuan 4. Setelah diberi perlakuan, kelompok perlakuan 4 kemudian diamati secara intensif seperti kelompok perlakuan 1, 2, dan 3 (OECD, 2001).

3.7.5 Terminasi Hewan Coba

Setelah diberi perlakuan, tikus putih dari tiap kelompok dianestesi dengan kloroform secara inhalasi untuk mengurangi nyeri, distress atau kecemasan sampel. Proses terminasi dilakukan dengan cara *cervical dislocation*. Proses *cervical dislocation* dilakukan dengan meletakkan ujung ibu jari dan jari telunjuk di setiap sisi leher tikus untuk memberikan tekanan bagian posterior dasar tulang tengkorak ke sumsum tulang belakang, sementara bagian tangan lainnya memegang bagian ekor dan dengan cepat ditarik sehingga terjadi pemisahan vertebra servikal dari tulang tengkorak dan terjadi pemisahan sumsum tulang belakang dari otak. Lalu dilakukan laparotomi untuk mengambil kelenjar adrenal (*American Veterinary Medical Association, 2020*).

3.7.6 Proses Pembuatan Preparat

Proses pembuatan preparat histopatologi pada kelenjar adrenal dilakukan dengan prosedur sebagai berikut :

1) Fiksasi

Jaringan difiksasi dalam larutan *Buffer Neutral Formalin* (BNF) 10% selama 3 jam dan dicuci menggunakan air mengalir sebanyak 3-5 kali.

2) *Trimming*

Sampel organ yang sudah terfiksasi dengan sempurna selanjutnya dilakukan *trimming* atau dikecilkan menjadi setebal $\pm 0,5$ cm. Potongan tersebut kemudian dimasukkan dalam *tissue cassette* untuk dimasukkan dalam *automatic tissue processor*.

3) Dehidrasi

Proses dehidrasi dilakukan dengan cara merendam sampel dalam larutan alkohol dengan konsentrasi bertingkat dan dalam durasi sebagai berikut :

- a. Alkohol 70% selama 45 menit
- b. Alkohol 80% selama 45 menit
- c. Alkohol 96% selama 45 menit
- d. Alkohol absolut selama 45 menit
- e. Alkohol absolut selama 45 menit

4) *Clearing*

Proses *clearing* dilakukan dengan menggunakan xylol I dan xylol II masing-masing selama 60 menit. Xylol berfungsi untuk melarutkan alkohol dan parafin.

5) Infiltrasi

Infiltrasi dilakukan dengan cara merendam jaringan ke larutan parafin cair dalam oven pada temperatur 60°C selama 1 jam.

6) *Embedding* atau *Blocking*

Berikut merupakan tahapan dari *embedding* :

- a. Sisa parafin yang ada pada *base mold* dibersihkan dengan cara dipanaskan beberapa saat di atas api dan diusap dengan kapas.
- b. Parafin diletakkan pada cangkir logam dan dimasukkan ke dalam oven dengan suhu di atas 58°C.
- c. Parafin cair dituangkan ke dalam *base mold*.
- d. Dipindahkan satu persatu dari *tissue cassette* ke dasar *base mold* dengan mengatur jarak satu dengan yang lainnya.
- e. *Base mold* dimasukkan ke dalam air.

- f. Parafin yang berisi potongan organ dilepaskan dari *base mold* dengan dimasukkan ke dalam suhu 4 – 6 °C beberapa saat.
- g. Parafin dipotong sesuai dengan letak jaringan yang ada dengan menggunakan skalpel/pisau hangat.
- h. Siap dipotong dengan mikrotom.

7) *Sectioning*

Sectioning adalah proses pemotongan jaringan dengan menggunakan mikrotom. Sebelum jaringan dipotong, jaringan didinginkan terlebih dahulu di dalam lemari es. Proses *sectioning* dilakukan di ruangan yang dingin dan menggunakan *rotary microtome* dengan *disposable knife*. Jaringan dipotong dengan ketebalan sekitar 4-5 µm dan selanjutnya dipindahkan ke dalam *waterbath* pada suhu 60°C selama beberapa detik sampai mengembang dengan sempurna. Jaringan kemudian diletakkan pada *object glass* dan disimpan dalam inkubator dengan suhu 37°C selama 24 jam sampai jaringan melekat dengan sempurna (Suvarna *et al.*, 2019).

3.7.7 Pewarnaan *Hematoxylin-Eosin*

Sebelum dilakukan proses pewarnaan, preparat histopatologi dideparafinisasi dengan larutan xylol I dan II selama 5 menit serta etanol absolut selama 60 menit. Kemudian dilakukan proses rehidrasi dengan cara merendamkan sediaan ke dalam alkohol bertingkat (alkohol absolut, alkohol 96% dan alkohol 70%). Perendaman dalam alkohol 96% dan 70% dilakukan selama 2 menit. Sediaan selanjutnya dicuci dengan air mengalir selama 10 menit. Setelah itu sediaan dapat diwarnai dengan pewarna *Mayer's Hematoxylin* melalui tahapan sebagai berikut :

- 1) Preparat direndam dalam larutan *Mayer's Hematoxylin* selama 8 menit.
- 2) Preparat dicuci dengan air mengalir selama 30 detik.
- 3) Preparat dicelupkan ke dalam larutan lithium karbonat selama 15-30 detik.

- 4) Preparat dicuci dengan air mengalir selama 2 menit.
- 5) Preparat direndam dalam larutan eosin selama 2 – 3 menit.
- 6) Preparat dicuci kembali dengan air mengalir selama 30-60 detik.
- 7) Dilakukan proses dehidrasi dengan cara merendam preparat ke dalam larutan alkohol 70% dan alkohol 96% selama 2 menit lalu preparat dicuci dengan air selama 10 menit. Setelah itu dilakukan penjernihan dengan xylol I selama 1 menit dan xylol II selama 2 menit.
- 8) *Mounting*, setelah tahapan pewarnaan selesai, *object glass* ditetesi dengan entelan dan ditutup dengan *cover glass*.

3.7.8 Pengamatan Preparat di Bawah Mikroskop

Preparat diamati menggunakan mikroskop cahaya perbesaran 4x dengan menilai ukuran luas area medula adrenal dan ketebalan korteks adrenal. Penilaian luas area medula adrenal dilakukan dengan menggunakan *Software ImageJ*, sedangkan penilaian ketebalan korteks adrenal dilakukan dengan menggunakan *Software Olympus Stream J* (Ryu & Roh, 2019; Aguila *et al.*, 2018).

3.8 Pengolahan Data

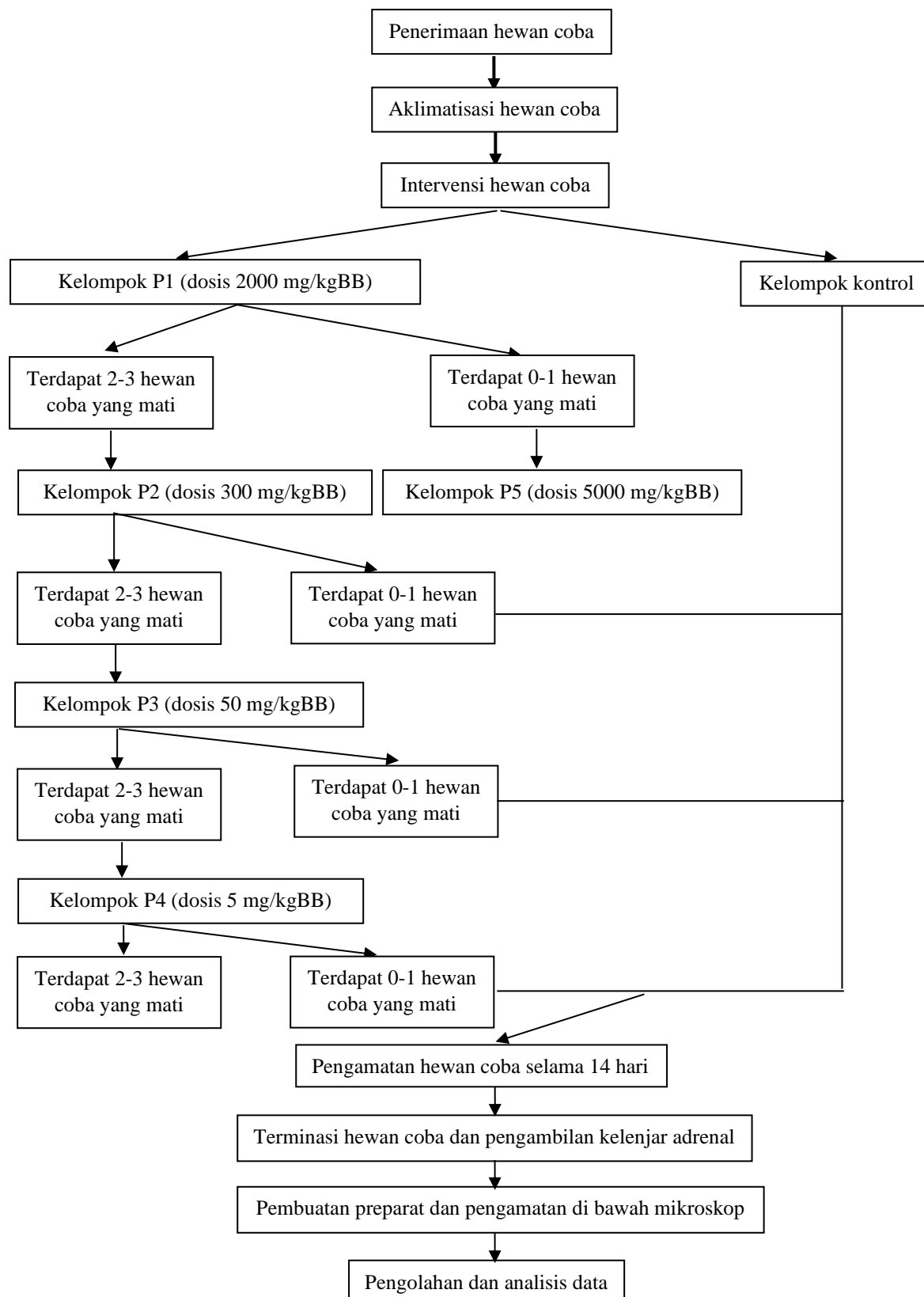
Data yang telah diperoleh dari proses pengumpulan data diubah ke dalam bentuk tabel-tabel kemudian diolah menggunakan program *software* uji statistik dengan nilai $\alpha = 0,05$. Menurut Notoatmodjo (2010), proses pengolahan data menggunakan program komputer terdiri dari beberapa langkah, yaitu :

- 1) *Coding*, mengonversikan data yang telah dikumpulkan selama penelitian ke dalam simbol yang cocok untuk memudahkan proses analisis.
- 2) *Data entry*, memasukkan data ke dalam komputer.
- 3) Verifikasi, pemeriksaan secara visual terhadap data yang telah dimasukkan ke dalam komputer.
- 4) *Output* komputer, hasil yang telah dianalisis oleh komputer kemudian dicetak.

3.9 Analisis Data

Analisis data dilakukan menggunakan *software* uji statistik dan diawali dengan melakukan uji normalitas untuk melihat normal atau tidaknya persebaran data. Uji normalitas dilakukan dengan menggunakan uji *Shapiro Wilk* karena jumlah sampel ≤ 50 . Analisis data kemudian dilanjutkan dengan menilai homogenitas variansi data menggunakan uji *Levene's test*. Data yang terdistribusi normal dan homogen dilakukan analisis parametrik menggunakan uji *One Way ANOVA*, sedangkan data yang tidak terdistribusi normal dan tidak homogen dilakukan analisis non parametrik menggunakan uji *Kruskal Wallis*. Analisis *Post Hoc* LSD perlu dilakukan apabila dari uji *One Way ANOVA* menunjukkan hasil $p < 0,05$ untuk menilai perbedaan bermakna antar kelompok (Dahlan, 2014).

3.10 Alur Penelitian



Gambar 3. 2. Alur Penelitian

3.11 *Ethical Clearance*

Penelitian ini telah mendapatkan persetujuan etik dari Komite Etik Penelitian Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Lampung dengan nomor surat 466/UN26.18/PP.05.02.00/2022. Penelitian ini dilakukan dengan mengutamakan tiga prinsip etik pada hewan coba yaitu 3R: *replacement*, *reduction*, dan *refinement* serta lima prinsip etik pada hewan coba yaitu 5F: *Freedom from hunger or thirst*, *freedom from discomfort*, *freedom from pain injury or disease*, *freedom to express (most) normal behavior*, dan *freedom from fear and distress*.

BAB V

SIMPULAN DAN SARAN

5.1 Simpulan

Berdasarkan hasil penelitian serta pembahasan yang telah dipaparkan, maka dapat disimpulkan bahwa terdapat pengaruh uji toksisitas akut dosis tunggal ekstrak kopi robusta (*Coffea canephora*) terhadap gambaran histopatologi kelenjar adrenal tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur Sprague-Dawley menggunakan *guideline* uji OECD No. 423.

5.2 Saran

Saran pada penelitian ini adalah sebagai berikut:

- 1) Dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai uji toksisitas ekstrak kopi robusta (*Coffea canephora*) terhadap gambaran histopatologi kelenjar adrenal dalam waktu pemberian subakut atau kronis.
- 2) Dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai kadar hormon kortisol, *Adrenocorticotropic Hormone* (ACTH), dan epinefrin akibat pemberian ekstrak kopi robusta (*Coffea canephora*).
- 3) Dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai uji toksisitas akut dengan jenis kopi yang berbeda, misalnya dengan menggunakan kopi arabika (*Coffea arabica L.*)

DAFTAR PUSTAKA

- Adiyati PN. 2011. Ragam jenis ektoparasit hewan coba tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur sprague-dawley [Skripsi]. Bogor: Fakultas Kedokteran Hewan Institut Pertanian Bogor.
- Aguila D, Romero EC, Castelan F, Gomez MM, Antolin JR, Toledo LN. 2018. Chronic stress and high sucrose intake cause distinctive morphometric effects in the adrenal glands of post-weaned rats. *Journal of Biotechnic & Histochemistry*. 93(8): 565-74.
- Agustina K. 2017. Kesejahteraan hewan laboratorium [disertasi]. Badung: Universitas Udayana.
- Agustina R, Nurba D, Antono W, Septiana R. 2019. Pengaruh suhu dan lama penyangraian terhadap sifat fisika-kimia kopi arabika dan kopi robusta. *Jurnal Prosiding Seminar Nasional Inovasi Teknologi Untuk Masyarakat*. 53(9): 285–99.
- Amaresh N, Mullaicharam AR, El-Khider MA. 2011. Chemistry and pharmacology of caffeine in different types of tea. *Journal of Nutrition, Pharmacology, Neurological Diseases*. 1(2): 110-5.
- American Veterinary Medical Association. 2020. AVMA guidelines for the euthanasia of animals: 2020 edition. USA: American Veterinary Medical Association.
- Badan Pusat Statistik. 2020. Statistik kopi indonesia 2019. Jakarta: Badan Pusat Statistik.
- Baranowski ES, Arlt W, Idkowiak J. 2018. Monogenic disorders of adrenal steroidogenesis. *Journal of Hormone Research in Paediatrics*. 89(5): 1-19.

- Belitz HD, Grosch W, Schieberle P. 2009. Food chemistry. Edisi ke-4. Berlin: Springer-Verlag.
- BPOM. 2014. Peraturan kepala badan pengawas obat dan makanan republik indonesia nomor 7 tahun 2014 tentang pemodan uji toksisitas nonklinik secara in vivo. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia.
- Burford NG, Webster NA, Cruz-Topete D. 2017. Hypothalamic-pituitary-adrenal axis modulation of glucocorticoids in the cardiovascular system. *International Journal of Molecular Sciences*. 18(10): 2150-8.
- Butt MS, Sultan MT. 2011. Coffee and its consumption: benefits and risks. *Journal of Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 51(4): 363-73.
- Chapman CM. 2019. Troubleshooting in the histology laboratory. *Journal of Histotechnology*. 42(3):137-49.
- Dahlan MS. 2014. Statistik untuk kedokteran dan kesehatan. Jakarta: PT Epidemiologi Indonesia.
- Dorostghoal M, Majd NE, Nooraei P. 2012. Maternal caffeine consumption has irreversible effects on reproductive parameters and fertility in male offspring rats. *Journal of Clinical and Experimental Reproductive Medicine*. 39(4): 144-52.
- Dutt M, Wehrle CJ, Jialal I. 2021. Physiology, adrenal gland. Treasure Island Florida: Statpearls Publishing.
- Dewajanti A. 2019. Peranan asam klorogenat tanaman kopi terhadap penurunan kadar asam urat dan beban oksidatif. *Jurnal kedokteran Meditek*. 25(1): 46-51.
- Dewi, Djusena, Hidayat. 2012. Perbandingan efek seduhan kopi robusta dan kopi arabika terhadap tekanan darah wanita dewasa. *Jurnal Kesehatan Masyarakat*. 11(2): 110-6.
- Erickson L. 2014. Atlas of endocrine pathology. London: Springer.

- Eroschenko VP. 2012. Atlas histologi difiore: dengan korelasi fungsional. Edisi ke-11. Jakarta: EGC.
- Everds NE, Snyder PW, Bailey KL, Bolon B, Creasy DM, Foley GL, *et al.* 2013. Interpreting stress responses during routine toxicity studies: a review of the biology, impact, and assessment. *Journal of Toxicologic Pathology*. 41(4): 12-23.
- Fadri RA, Sayuti K, Nazir N, Suliansyah. 2019. Review proses penyangraian kopi dan terbentuknya akrilamida yang berhubungan dengan kesehatan. *Journal of Applied Agricultural Science and Technology*. 3(1): 129-45.
- Farag NH, Lovallo WR, Vincent AS, Thomas TL, Wilson MF. 2006. Cortisol responses to mental stress, exercise, and meals following caffeine intake in men and woman. *Journal Pharmacology, biochemistry, and behavior*. 83(3):441-47.
- Farah A. 2012. Coffee: emerging health effects and disease prevention first edition. USA: Wiley Blackwell Publishing Ltd.
- Farhaty N, Muchtaridi. 2016. Tinjauan kimia dan aspek farmakologi senyawa asam klorogenat pada biji kopi: review. *Jurnal Farmaka*. 14(1): 214-27.
- Flueck JL, Schaufelberger F, Lienert M, Schafer D, Wilhelm M, Perret C. 2016. Acute effects of caffeine on heart rate variability, blood pressure and tidal volume in paraplegic and tetraplegic compared to able-bodied individuals: a randomized, blinded trial. *Journal of The Public Library*. 11(10): 1-17.
- Foilib AR, Lui P, Romeo RD. 2011. The transformation of hormonal stress responses throughout puberty and adolescence. *Journal of Endocrinol*. 210(3): 391-8.
- Gabriel A. 2016. Suprarenal (adrenal) gland anatomy. [Online Journal][diakses 24 Agustus 2021. Tersedia dari: <https://emedicine.medscape.com/article/1898785-overview#a2>
- Green MR, McCormick CM. 2016. Sex and stress steroids in adolescence: gonadal regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the rat. *Journal of General and Comparative Endocrinology*. 4(2): 1-34.

- Hamni A, Gusri A, Suryadiwansa, Yanuar B, Tarkono. 2013. Potensi pengembangan teknologi proses produksi kopi lampung. *Jurnal Mechanical*. 4(1): 45-51.
- Haryanto B. 2012. Prospek tinggi bertanam kopi. Yogyakarta: Pustaka Baru Press.
- Hodge A, Sterner B. 2005. Toxicity classes. in: canadian center for occupational health and safety.
- International Coffee Organization. 2021. Word Coffee Consumption. International Coffee Organization.
- Kementerian Pertanian. 2021. Outlook kopi 2021. Jakarta: Pusat Data dan Sistem Informasi Pertanian, Sekretariat Jenderal-Kementerian Pertanian.
- Kim Y, Je Y, Giovannucci E. 2019. Coffee consumption and all-cause and cause-specific mortality: a meta-analysis by potential modifiers. *Journal of Epidemiology*. 34(8): 731-52.
- Kline GA, Prebtani AH, Leung AA, Schiffrin EL. 2017. Primary aldosteronism: A common cause of resistant hypertension. *Canadian Journal of Medical Association*. 189(22): 773-8.
- Lee JH, Oh MK, Lim JT, Kim HG, Lee WJ. 2016. Effect of coffee consumption on the progression of type 2 diabetes mellitus among prediabetic individuals. *Korean Journal of Family Medicine*. 37(1): 7-13.
- Lara AR, Mesa MD, Vela JA, Casuso RA, Vazquez CC. 2019. Acute/subacute and sub-chronic oral toxicity of a hydroxytyrosol-rich virgin olive oil extract. *Journal of Nutrients*. 11(9): 2133-45.
- Lovallo WR, Whitsett TL, Alabsi M, Sung BH, Vincent A, Wilson MF. 2005. Caffeine stimulation of cortisol secretion across the waking hours in relation to caffeine intake levels. *Journal Psychosomatic medicine*. 67(5): 634-39.
- Ludwid IA, Clifford M, Lean M, Ashihara H, Crozier A. 2015. Coffee: biochemistry and potential impact on health. *Journal Food and Functional*. 5(8): 1695-717.

- Megha R, Wehrle CJ, Kashyap S. 2021. Anatomy, abdomen and pelvis. Treasure Island Florida: StatPearl Publishing.
- Mescher AL. 2012. Histologi dasar junqueira. Edisi ke-12. Jakarta: EGC.
- Miller WL. 2018. The hypothalamic-pituitary-adrenal axis: a brief history. *Journal of Hormone Research in Paediatrics*. 89(4): 212-23.
- Miranda AM, Steluti J, Fisberg RM, Marchioni DM. 2017. Association between coffee consumption and its polyphenols with cardiovascular risk factors. *Journal of Nutrients*. 9(3): 276-9.
- Myers P, Armitage. 2004. Animal diversity web. [Online Journal][diakses 19 Agustus 2021]. Tersedia dari: http://animaldiversity.ummz.edu/site/accounts/informationrattus_norvegicus.html.
- Mordue DG, Monroy F, Regina ML, Dinarello CA, Sibley LD. 2001. Acute toxoplasmosis leads to lethal overproduction of cytokines. *Journal of Immunology*. 167: 4574-84
- National Coffee Association. 2013. Nation of coffee drinkers, across every demographic [Online][diakses 29 Agustus 2021]. Tersedia dari: <http://ctbythenumbers.info/2013/11/26/nation-coffee-drinkersacross-every-demographic/>
- Nurdiansyah Y, Wardana I, Tajuddin M, Islami NI. 2017. Menentukan bibit kopi yang cocok ditanam di kecamatan sumberjambe kabupaten jember menggunakan metode forward chaining. *Jurnal Informatics*. 2(3): 148-53.
- Nieber K. 2017. The impact of coffee on health author pharmacokinetics and mode of action bioactive components in coffee. *Journal of Planta Medica*. 83(16): 1256-63.
- Notoatmodjo S. 2010. Metodologi penelitian kesehatan. Jakarta: Rineka Cipta.
- OECD. 2001. OECD guidelines for the testing of chemicals, section 4 test no. 423: acute oral toxicity-acute toxic class method. OECD Publishing.

- Oyola MG, Handa RJ. 2017. Hypothalamic-pituitary-adrenal and hypothalamic-pituitary-gonadal axes: sex differences in regulation of stress responsivity. *Journal of Stress*. 20(5): 476-94.
- Owolabi J, Olatunji S, John A, Itilope O. 2017. Excessive caffeine intake disrupts testicular architecture, spermatogenesis and hormonal levels in experimental wistar rats. *Journal of Environmental Science*. 11(10): 8–18.
- Palembang Tikus Center. 2016. Tikus galur sprague-dawley. Produk Palembang Tikus Center [Online][diakses 29 Agustus 2021. Tersedia dari: <https://palembangtikuscenter.wordpress.com>
- Panggabean E. 2011. Buku pintar kopi. Jakarta Selatan: PT Agro Media.
- Paravati S, Warrington SJ. 2019. Physiology, catecholamines. Treasure Island Florida: StatPearls.
- Pireira GV, Neto DPC, Junior ALM, Prado FGD, Pagnoncelli MG, Karp SG, *et al.* 2020. Chemical composition and health properties of coffee and coffee by-products. *Journal of Advances in Food and Nutrition Research*. 91(3): 65-96.
- Prajapati SK, Dangi DS, Krishnamurthy S. 2019. Repeated caffeine administration aggravates post-traumatic stress disorder like symptoms in rats. *Journal of Physiology & Behavior*. 21(5): 186-92.
- Prawiranegara FA. 2015. Mikroteknik clearing (penjernihan) preparat [disertasi]. Medan: Fakultas Keguruan Ilmu Pendidikan Universitas Islam Sumatera Utara.
- Prastowo B. 2012. Kopi, budidaya dan penanganan lepas panen. Jakarta: Penebar Swadaya.
- Rahardjo P. 2012. Panduan budidaya dan pengolahan kopi arabika dan robusta. Jakarta: Penebar Swadaya.
- Ramnani D. 2015. Adrenal cortex histology. Visual Survey of Surgical Pathology.

- Randriani E, Dani B, Supriadi H, Syafaruddin. 2016. Ekspresi fenotipik klon kopi robusta "sidodadi" pada tiga ketinggian tempat. *Jurnal Tanaman Industri dan Penyegar*. 3(3): 151-8.
- Ren Y, Wang C, Xu J, Wang S. 2019. Cafestol and kahweol: A review on their bioactivities and pharmacological properties. *International Journal of Molecular Sciences*. 20(17): 1-15.
- Richards G, Smith A. 2015. Caffeine consumption and self-assessed stress, anxiety, and depression in secondary school children. *Journal of Psychopharmacology*. 29(12): 1236-47.
- Ryu KY, Roh J. 2019. The effects of high peripubertal caffeine exposure on the adrenal gland in immature male and female rats. *Journal of Nutrients*. 11(1): 1-11.
- Sari AIN, Kuntari. 2019. Penentuan kafein dan parasetamol dalam sediaan obat secara simultan menggunakan spektrofotometer uv-vis. *Journal of Chemical Analysis*. 2(1): 20-7.
- Schunke M, Schulte E, Schumancer U. 2017. Prometheus atlas anatomi manusia. Jakarta: EGC
- Sharma H. 2020. A detail chemistry of coffee and its analysis. *Journal of Coffee-Production and Research*. 2(6): 1-27.
- Sherwood L. 2018. Fisiologi manusia: dari sel ke sistem. Edisi ke- 8. Jakarta: EGC.
- Siebert M, Robert Y, Didier R, Minster A, M'sallaoiu W, Bellier A, *et al.* 2017. Anatomical variations of the venous drainage from the left adrenal gland: an anatomic study. *Journal of Surgery*. 41(4): 991-6.
- Sunggono BW, Kusharyanti I, Nurbaeti SN. 2014. Acute toxicity evaluation of *impatiens balsamina* Linn. STEM and leaf N-hexane fraction using OECD 425 guideline. *Journal of Traditional Medical*. 19(3): 118-26.
- Suckow MA, Steven H, Franklin. 2006. The laboratory rat. UK: Elsevier.

- Survana SK, Layton C, Bancroft JD. 2019. Bancroft's theory and practice of histological techniques 8th ed. Amsterdam: Elsevier.
- Swastika KD. 2012. Efek kopi terhadap kadar gula darah post prandial pada mahasiswa semester vii fakultas kedokteran usu tahun 2012 [skripsi]. Medan: Fakultas Kedokteran Universitas Sumatera Utara.
- Tajik N, Tajil M, Mack I, Enck P. 2017. The potential effects of chlorogenic acid, the main phenolic components in coffee on health: a comprehensive review of the literature. *Journal of Nutrition*. 56(7): 45-57.
- Tanauma HA, Citraningtyas G, Lolo WA. 2016. Aktivitas antibakteri ekstrak biji kopi robusta (*coffea canephora*) terhadap bakteri *E. coli*. *Jurnal Ilmiah Farmasi*. 5(4): 243-52.
- Thau L, Gandhi J, Sharma S. 2021. Physiology, Cortisol. Treasure Island Florida: Statpearls Publishing.
- Vignoli JA, Viegas MC, Bassoli DG, Benassi MT. 2014. Roasting process affects differently the bioactive compounds and the antioxidant activity of arabica and robusta coffees. *Journal of Food Research International*. 61: 279-85.
- Wagner CA. 2014. Effect of mineralocorticoids on acid-base balance. *Journal of Nephron-Physiology*. 128(2): 26-34.
- Wei F, Tanokura M. 2015. Organic compounds in green coffee beans. Singapore: Elsevier.
- Wiranata R, Herawati D. 2016. Pengaruh tingkat penyangraian terhadap karakteristik fisik dan kimia kopi robusta (*coffea canephora*) [tesis]. Bogor: Fakultas Teknologi Pertanian Institut Pertanian Bogor.
- Wright N, Burns B. 2020. Anatomy, abdomen and pelvis posterior abdominal wall arteries. Treasure Island Florida: Statpearls Publishing.
- Yaqin MA, Nurmilawati M. 2015. Pengaruh ekstrak kopi robusta sebagai penghambat pertumbuhan staphylococcus aureus. Surakarta: Universitas Sebelas Maret.