

**PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK BIJI KOPI ROBUSTA (*Coffea canephora*) LAMPUNG TERHADAP JUMLAH, MOTILITAS, dan MORFOLOGI SPERMATOZOA TIKUS PUTIH (*Rattus norvegicus*) JANTAN GALUR Sprague-dawley YANG DIINDUKSI MONOSODIUM GLUTAMAT
(Skripsi)**

Oleh

DEANA RIFQOH NABILAH



**PROGRAM STUDI PENDIDIKAN DOKTERFAKULTAS
KEDOKTERAN UNIVERSITAS LAMPUNG
2022**

PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK BIJI KOPI ROBUSTA (*Coffea canephora*) LAMPUNG TERHADAP JUMLAH, MOTILITAS, dan MORFOLOGI SPERMATOZOA TIKUS PUTIH (*Rattus norvegicus*) JANTAN GALUR Sprague-dawley YANG DIINDUKSI MONOSODIUM GLUTAMAT

Oleh

DEANA RIFQOH NABILAH

Skripsi

Sebagai Salah Satu Syarat Untuk Memperoleh Gelar SARJANA
KEDOKTERAN

Pada Fakultas Kedokteran
Universitas Lampung



**PROGRAM STUDI PENDIDIKAN DOKTERFAKULTAS
KEDOKTERAN UNIVERSITAS LAMPUNG
2022**

Judul Skripsi

: **PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK
BIJI KOPI ROBUSTA (*Coffea
canephora*) LAMPUNG TERHADAP
JUMLAH, MOTILITAS, DAN
MORFOLOGI SPERMATOZOA
TIKUS PUTIH (*Rattus norvegicus*)
JANTAN GALUR Sprague-dawley
YANG DIINDUKSI
MONOSODIUM GLUTAMAT**

Nama Mahasiswa

: **Deana Rifqoh Nabilah**

No. Pokok Mahasiswa

: 1818011114

Program Studi

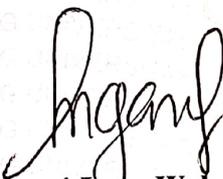
: Pendidikan Dokter

Fakultas

: Kedokteran

MENYETUJUI

Komisi Pembimbing


dr. Anggraeni Japar Wulan, S.Ked., M. Sc
NIP 198201302008122001


Dr. dr. Khairun Nisa Berawi, M. Kes., AIFO-K
NIP 197402262001122002

MENGETAHUI

Dekan Fakultas Kedokteran

Prof. Dr. Dyah Wulan Sumekar RW, S.K.M., M. Kes
NIP 19720628 199702 2 001

MENGESAHKAN

1. Tim Penguji

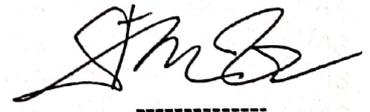
Ketua : dr. Anggraeni Janar Wulan, S. Ked., M. Sc



Sekretaris : Dr. dr. Khairun Nisa Berawi, M. Kes., AIFO-K



**Penguji
Bukan Pembimbing : Prof. Dr. Sutyarso, M. Biomed**



2. Dekan Fakultas Kedokteran

Prof. Dr. Dyah Wulan Sumekar RW, S.K.M., M. Kes
NIP 19720628 199702 2 001

Tanggal Lulus Ujian Skripsi : 20 Juni 2022

LEMBAR PERNYATAAN

Dengan ini saya menyatakan dengan sebenarnya, bahwa:

1. Skripsi dengan judul **“PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK BIJI KOPI ROBUSTA (*Coffea canephora*) LAMPUNG TERHADAP JUMLAH, MOTILITAS, DAN MORFOLOGI SPERMATOZOA TIKUS PUTIH (*Rattus norvegicus*) JANTAN GALUR Sprague-dawley YANG DIINDUKSI MONOSODIUM GLUTAMAT”** adalah hasil karya saya sendiri dan tidak melakukan penjiplakan atau pengutipan atas karya penulis lain dengan cara tidak sesuai tata 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, 20 Juni 2022
Pembuat Pernyataan



Deana Rifqoh Nabilah

RIWAYAT HIDUP

Penulis merupakan anak perempuan yang dilahirkan di Palu pada tanggal 29 April 1999, sebagai anak pertama dari dua bersaudara dari Ayah Miar Permana Arifiyanto, S.T., S.P., M. Si dan Ibu Dr. Dewi Wahyuni, S.P., M. Si. Penulis memiliki satu adik laki-laki yang bernama Muhammad Hanif Afriansyah.

Penulis menyelesaikan Pendidikan Taman Kanak-Kanak (TK) di TKIT Pelita Palu pada tahun 2005, Sekolah Dasar (SD) penulis diselesaikan di SDIT Al-Fahmi Palu pada tahun 2011, Sekolah Menengah Pertama (SMP) penulis diselesaikan di SMP Al-Azhar Mandiri Palu pada tahun 2014, dan Sekolah Menengah Atas (SMA) penulis diselesaikan di SMA Al-Azhar Mandiri Palu pada tahun 2017.

Pada tahun 2017, penulis terdaftar sebagai mahasiswa Fakultas Kelautan dan Ilmu Perikanan Institut Pertanian Bogor dan pada tahun 2018, penulis terdaftar sebagai mahasiswa Fakultas Kedokteran Universitas Lampung melalui jalur Seleksi Bersama Masuk Perguruan Tinggi Negeri (SBMPTN). Selama menjadi mahasiswa, penulis pernah aktif mengikuti organisasi Forum Studi Islam (FSI) Ibnu Sina periode 2019/2020 dan *Lampung University Medical Research* (Lunar) periode 2019/2020 sebagai anggota.

SANWACANA

Puji dan syukur penulis panjatkan kepada Allah SWT yang Maha Pengasih lagi Maha Penyayang yang telah memberikan rahmat serta karunia-Nya selama penyusunan skripsi ini sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Pengaruh Pemberian Ekstrak Biji Kopi Robusta (*Coffea canephora*) Lampung Terhadap Jumlah, Motilitas, dan Morfologi Spermatozoa Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Jantan Galur Sprague-dawley Yang Diinduksi Monosodium Glutamat”.

Dalam proses penulisan skripsi ini, penulis mendapatkan bantuan, bimbingan, saran, dan kritik dari berbagai pihak. Oleh karena itu, dalam kesempatan ini penulisingin mengucapkan rasa terimakasih kepada:

1. Prof. Dr. Karomani, M.Si., selaku Rektor Universitas Lampung.
2. Prof. Dr. Dyah Wulan Sumekar RW, SKM., M. Kes., selaku Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Lampung.
3. Dr. dr. Khairun Nisa Berawi, S. Ked., M. Kes., AIFO-K selaku Kepala Program Studi Fakultas Kedokteran Universitas Lampung.
4. dr. Anggraeni Janar Wulan, S.Ked., M.Sc., selaku Pembimbing I, yang telah membimbing penulis dengan sebaik-baiknya serta memberikan masukan dan motivasi yang sangat berharga bagi penulis, terimakasih dokter atas waktu dan pelajaran yang sudah diberikan.
5. Dr. dr. Khairun Nisa Berawi, S. Ked., M. Kes., AIFO-K, selaku Pembimbing II, yang telah memberikan kesediaan waktu untuk membimbing dan memberikan masukan selama proses penulisan skripsi, terima kasih dokter telah memaklumi kekurangan penulis selama bimbingan.

6. Prof. Dr. Sutyarso, M. Biomed., selaku penguji utama, terima kasih atas waktu, saran, dan ilmu yang telah diberikan dalam proses penulisan skripsi ini.
7. Prof. Dr. Tati Suhartati, M.S. yang telah memberikan bimbingan dan masukan dalam penghitungan dosis ekstrak biji kopi Robusta Lampung secara detail.
8. dr. Waluyo Rudiyanto, S. Ked., M. Kes., Sp. KKLP., selaku Pembimbing Akademik. Terimakasih telah membimbing penulis dengan sebaik-baiknya serta memberikan masukan dan motivasi yang sangat berharga bagi penulis.
9. Seluruh dosen, staff, dan karyawan atas ilmu, waktu, dan bantuan yang telah diberikan selama proses perkuliahan sampai penyusunan skripsi.
10. Kepada kedua orang tua penulis, Ayah (Miar Permana Arifiyanto, S.T., S.P., M. Si) dan Ibu (Dr. Dewi Wahyuni, S.P., M. Si), terima kasih atas segala doa, semangat, restu, nasihat, kasih sayang yang luar biasa bagi penulis sehingga tetap kuat menjalani proses perkuliahan sampai penyusunan skripsi ini.
11. Kepada adik penulis, Muhammad Hanif Afriansyah, terima kasih atas doa dan dukungannya bagi penulis.
12. Sahabat seperjuangan penulis yang selalu menemani di hari-hari sulit dan bahagia selama proses perkuliahan, terima kasih banyak Alfina Indah, Nabila Rayhan, Inas Dzakhirah, dan Athaya Taufiqy
13. Sahabat penulis, Arra Sabrina, Rifdah Shohwatul, dan Zayyani Trianti, terima kasih karena selalu mendoakan dan memotivasi penulis selama masa perkuliahan.
14. Teman-teman penelitian, untuk Aina, Tyara, dan Yahmal, terima kasih atas kerjasama, bantuan, dan motivasinya selama proses pengerjaan skripsi ini.
15. Teman-teman angkatan 2018 (F18RINOGEN) yang tidak dapat disebutkan satu persatu, terima kasih atas bantuan dan dukungan selama proses perkuliahan.

Semoga Allah SWT senantiasa memberikan rahmat dan balasan yang berlipat atas segala bantuan dan kebaikan yang telah diberikan kepada penulis dalam menyelesaikan skripsi ini. Aamiin Ya Robbal'Alaamiin.

Bandar Lampung, 20 Juni 2022



Penulis
Deana Rifqoh Nabilah

ABSTRACT

The Effect Of Lampung Robusta Coffee Bean (*Coffea canephora*) Extract To The Sperm Number, Motility, and Morphology Of Male White Rats (*Rattus norvegicus*) Sprague-dawley Strain Induced By Monosodium Glutamate

By

Deana Rifqoh Nabilah

Background: Infertile can be caused by excessive consumption of monosodium glutamate that can induce oxidative stress and cause spermatogenesis damage. The caffeine and chlorogenic acid contained in robusta coffee beans have the potential as antioxidants that can protect against oxidative damage.

Method: This research is an experimental study with a Completely Randomized Design (CRD) and a Posttest Only Control Group Design approach. This research was conducted for 14 days. The samples used were 25 rats which were divided into 5 groups, namely K- (aquades 3 ml/day), K+ (MSG 4 g/kgBW/day), P1, P2, and P3 (MSG 4 g/kgBW/day and Lampung Robusta coffee bean extract 1 ml/200gBW/day with a concentration of 0.006 g/ml; 0.012 g/ml; 0.024 g/ml respectively). The dependent variables were the number, motility, and morphology of spermatozoa.

Results: The average of sperm number (10^6 /ml) in K-, K+, P1, P2, and P3 were 64,3; 23,25; 44,75; 36,85; 34,2. Sperm motility (%) in K-, K+, P1, P2, and P3 were 60,33; 53,14; 70,71; 61,33; 46,33. While sperm morphology (%) in K-, K+, P1, P2, and P3 were 76,25; 42,5; 64,14; 56,5; 58,25. Analysis using One Way ANOVA obtained p value=0.000 ($p<0.05$) for number, motility, and morphology of spermatozoa. Post Hoc LSD test on the average number, motility, and morphology spermatozoa showed a significant difference ($p<0.05$) between K- with K+, and K+ with each P1, P2, P3.

Conclusion: There is an effect of Lampung Robusta coffee bean (*coffea canephora*) extract to the sperm number, motility, and morphology of male white rats (*Rattus norvegicus*) Sprague-dawley strain induced by monosodium glutamate.

Keywords: Robusta coffee, monosodium glutamate, total sperm, sperm motility, sperm morphology.

ABSTRAK

PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK BIJI KOPI ROBUSTA (*Coffea canephora*) LAMPUNG TERHADAP JUMLAH, MOTILITAS, dan MORFOLOGI SPERMATOZOA TIKUS PUTIH (*Rattus norvegicus*) JANTAN GALUR Sprague-dawley YANG DIINDUKSI MONOSODIUM GLUTAMAT

Oleh

Deana Rifqoh Nabilah

Latar Belakang: Salah satu penyebab infertilitas ialah konsumsi MSG yang berlebihan. Konsumsi MSG yang berlebihan dapat menginduksi stress oksidatif yang akan memengaruhi spermatogenesis. Kafein dan asam klorogenat yang terkandung dalam biji kopi robusta memiliki potensi sebagai antioksidan yang dapat melindungi dari kerusakan oksidatif tersebut.

Metode: Penelitian eksperimental dengan desain Rancangan Acak Lengkap (RAL) dan pendekatan *posttest only control group design*. Penelitian dilakukan 14 hari menggunakan 25 ekor tikus yang terbagi dalam 5 kelompok, K- (aquades 3 ml/hari), K+ (MSG 4 g/kgBB/hari), P1, P2, dan P3 (MSG 4 g/kgBB/hari dan ekstrak biji kopi Robusta lampung 1 ml/200gBB konsentrasi 0,006 g/ml; 0,012 g/ml; 0,024 g/ml). Variabel dependen penelitian ini adalah jumlah, motilitas, dan morfologi spermatozoa.

Hasil: Hasil rerata jumlah spermatozoa (juta/ml) pada K-, K+, P1, P2, dan P3 adalah 64,3; 23,25; 44,75; 36,85; 34,2. Hasil rerata motilitas spermatozoa (%) pada K-, K+, P1, P2, dan P3 adalah 60,33; 53,14; 70,71; 61,33; 46,33. Hasil rerata morfologi spermatozoa (%) pada K-, K+, P1, P2, dan P3 adalah 76,25; 42,5; 64,14; 56,5; 58,25. Uji *One Way ANOVA* didapatkan nilai $p=0,000$ ($p<0,05$) untuk jumlah, motilitas, dan morfologi spermatozoa. Uji *Post Hoc LSD* terhadap rerata jumlah, motilitas, dan morfologi spermatozoa menunjukkan perbedaan yang bermakna ($p<0,05$) antara K- dan K+; serta K+ dengan P1, P2, dan P3.

Simpulan: Terdapat pengaruh pemberian ekstrak biji kopi Robusta (*Coffea canephora*) Lampung terhadap jumlah, motilitas, dan morfologi spermatozoa tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan galur Sprague-dawley yang diinduksi monosodium glutamat.

Kata Kunci: Kopi Robusta, monosodium glutamat, jumlah sperma, motilitas sperma, morfologi sperma.

DAFTAR ISI

	Halaman
DAFTAR ISI	i
DAFTAR TABEL	iii
DAFTAR GAMBAR	iv
DAFTAR SINGKATAN	vi
 BAB I PENDAHULUAN	
1.1 Latar belakang	1
1.2 Rumusan masalah.....	4
1.3 Tujuan penelitian	4
1.3.1 Tujuan umum.....	4
1.3.2 Tujuan khusus.....	4
1.4 Manfaat penelitian	5
1.4.1 Bagi Peneliti	5
1.4.2 Bagi Institusi.....	5
1.4.3 Bagi Masyarakat	5
1.4.4 Bagi Penelitian Lain.....	5
 BAB II TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 Kopi Robusta.....	6
2.1.1 Klasifikasi Tanaman Kopi Robusta	6
2.1.2 Kopi Sebagai Antioksidan.....	7
2.1.3 Penyangraian, Penyeduhan, dan Ekstraksi Biji Kopi Robusta Lampung	10
2.2 Anatomi Testis	12
2.3 Fisiologi	13
2.3.1 Spermatogenesis	13
2.3.2 Spermiogenesis	16
2.3.3 Pengaruh Hormon dalam Spermatogenesis.....	16
2.3.4 Jumlah Spermatozoa	17
2.3.5 Motilitas Spermatozoa	18
2.3.6 Morfologi Spermatozoa	19
2.4 Monosodium Glutamat	20
2.4.1 Definisi Monosodium Glutamat	20
2.4.2 Metabolisme Monosodium Glutamat	22

2.4.3 Toksisitas Monosodium Glutamat	23
2.5 Pengaruh Monosodium Glutamat terhadap Testis	24
2.6 Tikus Putih (<i>Rattus norvegicus</i>) Galur Sparague dawley	26
2.7 Kerangka Teori.....	28
2.8 Kerangka Konsep	29
2.9 Hipotesis	29

BAB III METODE PENELITIAN

3.1 Jenis dan Desain Penelitian.....	30
3.2 Waktu dan Tempat Penelitian	30
3.2.1 Waktu Penelitian.....	30
3.2.2 Tempat Penelitian	30
3.3 Subyek Penelitian	31
3.3.1 Populasi	31
3.3.2 Sampel.....	31
3.3.3 Kelompok Perlakuan.....	33
3.3.4 Kriteria Inklusi dan Eksklusi	33
3.4 Identifikasi Variabel dan Definisi Operasional.....	34
3.4.1 Variabel Penelitian.....	34
3.4.2 Definisi Operasional Variabel Penelitian.....	34
3.5 Alat dan Bahan	36
3.5.1 Alat Penelitian	36
3.5.2 Bahan Penelitian	37
3.6 Prosedur Penelitian	37
3.6.1 Ethical clearance	37
3.6.2 Pengadaan Hewan Uji	37
3.6.3 Pemeliharaan Hewan Uji.....	37
3.6.4 Aklimatisasi Hewan Uji	38
3.6.5 Pembagian Kelompok	38
3.6.6 Pembuatan Larutan Monosodium Glutamat	38
3.6.7 Pengadaan Biji Kopi Robusta Lampung	39
3.6.8 Penyangraian Biji Kopi Robusta Lampung.....	39
3.6.9. Penentuan Dosis Ekstrak Biji Kopi Robusta Lampung	39
3.6.9.1 Pembuatan Larutan Bubuk Kopi Robusta Lampung	39
3.6.9.2 Pembuatan Ekstrak Biji Kopi Robusta Lampung.....	41
3.6.9.3 Pembuatan Larutan Ekstrak Biji Kopi Robusta Lampung.	44
3.6.10 Pemberian Perlakuan	45
3.6.11 Pengambilan Bagian Testis	47
3.6.12 Pengambilan dan Pengamatan Spermatozoa	47
3.7 Analisis Data	50
3.8 Alur Penelitian Data	51
3.10 Etika Penelitian.....	52

BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1. Hasil Penelitian	53
4.1.1. Jumlah Spermatozoa	53
4.1.2. Motilitas Spermatozoa	56
4.1.3. Morfologi Spermatozoa	58
4.2. Pembahasan	61
4.3. Keterbatasan Penelitian	67

BAB V SIMPULAN DAN SARAN

5.1. Simpulan	68
5.2. Saran	68

DAFTAR PUSTAKA	68
-----------------------------	----

LAMPIRAN	74
-----------------------	----

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
Tabel 1. Data Fisiologis Umum Tikus Putih (<i>Rattus norvegicus</i>).....	27
Tabel 2. Definisi Operasional.....	35
Tabel 3. Rerata Jumlah Spermatozoa.....	53
Tabel 4. Analisis Data Jumlah Spermatozoa.....	54
Tabel 5. Uji <i>Post Hoc</i> LSD Jumlah Spermatozoa.....	55
Tabel 6. Rerata Motilitas Spermatozoa.....	56
Tabel 7. Analisis Data Motilitas Spermatozoa.....	57
Tabel 8. Uji <i>Post Hoc</i> LSD Motilitas Spermatozoa.....	57
Tabel 9. Rerata Morfologi Spermatozoa.....	58
Tabel 10. Analisis Data Morfologi Spermatozoa.....	59
Tabel 11. Uji <i>Post Hoc</i> LSD Morfologi Spermatozoa.....	60

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
Gambar 1. Perbandingan Biji Kopi Arabika dengan Biji Kopi Robusta	7
Gambar 2. Struktur Kimia Asam Klorogenat.....	8
Gambar 3. Potongan Sagittal Testis.....	13
Gambar 4. Spermatogenesis	15
Gambar 5. Jumlah Spermatozoa.....	18
Gambar 6. Motilitas Spermatozoa	19
Gambar 7. Abnormalitas Morfologi Spermatozoa	20
Gambar 8. Struktur Kimia MSG.....	20
Gambar 9. Siklus Metabolik Glutamat	22
Gambar 10. Tikus Putih (<i>Rattus norvegicus</i>) Galur Sparague-dawley.....	26
Gambar 11. Kerangka Teori.....	28
Gambar 12. Kerangka Konsep	28
Gambar 13. Alur Penelitian.....	51

DAFTAR ISTILAH

1. 5-CQA : 5-caffeoylquinic acid
2. ALT : Alanin Aminotransferase
3. AST : Aspartate Aminotransferas
4. ATP : Adenosin Tripospat
5. BPOM : Badan Pengawas Obat dan Makanan
6. BPS : Badan Pusat Statistik
7. cAMP : Cyclic Adenosine Monophosphate
8. CDK : Cyclin-dependent Kinase
9. CRS : Chinese Restaurant Syndrome
10. EFSA : European Food Safety Authority
11. FDA : Food and Drugs Administration
12. FSH : Follicle Stimulating Hormone
13. GDH : Glutamate Dehidrogenase
14. GnRH : Gonadotropin Releasing Hormone
15. JECFA : Joint Expert Committee on Food Additives
16. LH : Luteinizing Hormone
17. MAPK : Mitogen-Activated Protein Kinase
18. MDA : Malondialdehyde
19. MSG : Monosodium Glutamat
20. NF-E2 : Nuclear Factor Erythroid 2
21. NrF2 : Nuclear Released Factor 2
22. PR : Perkebunan Rakyat
23. ROS : Reactive Oxygen Species
24. SOD : Superoxyde Dismutase Hormone
25. TCA : Tricarboyclic Acid
26. WHO : World Health Organization

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar belakang

Infertilitas atau ketidaksuburan dapat didefinisikan sebagai kondisi dimana pasangan suami istri belum memiliki keturunan setelah 1 tahun usia pernikahan dengan hubungan seksual yang teratur tanpa menggunakan alat kontrasepsi dalam bentuk apapun atau setelah enam bulan menikah, atau bila pasangan suami istri telah berusia diatas 35 tahun (Priyatni and Rahayu, 2016). *World Health Organization* (WHO) memperkirakan sebanyak 48 juta pasangan dan 186 individu memiliki masalah infertilitas (WHO, 2020). Adapun menurut Badan Pusat Statistik (BPS) tahun 2013, prevalensi pasangan infertil di Indonesia sebanyak 15-25% dari total pasangan yang ada (Risikesdas, 2013).

Pada pria terdapat dua faktor penyebab infertilitas yaitu faktor umum seperti umur, frekuensi senggama, dan lama berusaha, sedangkan faktor khusus yaitu adanya kelainan pada *pre-testikuler*, *testikuler*, *post-testikuler*, reaksi imunologi, dan lingkungan (Akbar A, 2020). Monosodium glutamat (MSG) dapat menyebabkan infertilitas pada pria akibat stress oksidatif yang ditimbulkan. Hal ini merupakan salah satu penyebab testikuler pada infertilitas yang dapat menurunkan kualitas sperma diantaranya rendahnya jumlah sperma (*oligozoospermia*), abnormalitas morfologi (*teratozoospermia*) dan motilitas sperma (*asthenozoospermia*) (Rahmadiani D, 2021).

Monosodium glutamat (MSG) berupa bubuk kristal berwarna putih sejak lama telah digunakan sebagai bahan tambahan pada berbagai jenis makanan

di berbagai negara. Kandungan garam natrium asam glutamat pada MSG berfungsi sebagai penguat dan penyedap rasa bila ditambahkan terutama pada makanan yang mengandung protein. Glutamat adalah salah satu jenis asam amino penyusun protein dan merupakan komponen alami dalam setiap makhluk hidup baik dalam bentuk terikat maupun bebas. Reseptor dan transporter glutamat banyak terdapat di organ-organ reproduksi pria, yaitu testis, epididimis, vesikula seminalis, dan prostat. Tingginya kadar glutamat dapat mempengaruhi siklus asam trikarbosiklik sehingga dapat meningkatkan aktifitas alfa-ketoglutarat dehidrogenase. Hal ini dapat meningkatkan produksi *Reactive Oxygen Species* (ROS) sehingga terjadi stress oksidatif. Terikatnya glutamat pada reseptornya juga dapat meningkatkan masuknya Ca^{2+} ke dalam sel yang akan mengakibatkan kerusakan sel (Jubaidi *et al.*, 2019).

Berdasarkan anjuran Badan Pengawas Obat dan Makanan (BPOM) dan *Joint Expert Committee on Food Additives* (JECFA), MSG boleh digunakan sebagai bahan tambahan pangan dalam takaran yang diperlukan untuk mencapai efek berupa rasa yang diinginkan atau *Acceptable Daily Intake not specified* (Muntaza Y, Annis CA., 2020). Namun WHO menganjurkan konsumsi MSG tiap hari per orang tidak boleh lebih dari 120mg/KgBB/hari (Sulastris S, 2017).

Pada beberapa penelitian dengan hewan coba, pemberian MSG dengan dosis 4,8g/kgBB; 7,2g/KgBB; dan 9,6g/KgBB selama 20 hari secara peroral pada tikus jantan (*Rattus norvegicus*) dapat menurunkan kadar FSH dan LH (Edward Z, 2015). Selain itu pemberian MSG dengan dosis 6 g/KgBB selama 14 hari secara peroral pada tikus wistar jantan dapat menurunkan motilitas, menurunkan jumlah morfologi normal sperma dan menurunkan jumlah sel leydig (Kadir, 2011). Dan juga pemberian dosis MSG sebanyak 4 g/KgBB selama 10 hari secara peroral pada tikus jantan (*Rattus norvegicus*) dapat menurunkan jumlah spermatosit primer dan meningkatkan nekrosis sel spermatogenik (Mohamed, 2012).

Pada tahun 2019, Indonesia memproduksi kopi sebanyak 742 ribu ton. Lampung menempati urutan ke-2 setelah Sumatera Selatan sebagai provinsi yang paling banyak memproduksi kopi di tahun 2019 yaitu sebanyak 110 ribu ton (Badan Pusat Statistik, 2019). Provinsi Lampung memproduksi kopi robusta sebanyak 236 ribu ton pada tahun 2018 (Direktorat Jendral Perkebunan, 2017).

Antioksidan dilaporkan memainkan peran penting terhadap perlindungan dari kerusakan oksidatif MSG terhadap testis. Peran kopi sebagai antioksidan terhadap penyebab infertilitas testikuler ialah salah satunya dengan meningkatkan aktivasi gen antioksidan *Nuclear Factor Erythroid 2* (NF-E2) – *Released Factor 2* [Nrf2] yang akan melepaskan hormone Superoksida Dismutase (SOD). Hal ini dapat menyebabkan perbaikan dari spermatogenesis akibat terjadi penurunan kadar radikal bebas dalam tubuh (Alrizaldi A *et al.*, 2021). Salah satu antioksidan yang dapat digunakan adalah kopi. Asam klorogenat dan kafein adalah antioksidan kuat yang sebagian besar ditemukan dalam biji kopi. Kandungan asam klorogenat yang terdapat di biji kopi robusta adalah 6,1-11,3 mg/g biji kopi (Farhaty N, Muchtarid, 2016).

Penelitian yang dilakukan oleh Metro D, *et al* (2017) menyatakan bahwa pemberian kafein sebanyak 5mg/KgBB/hari dalam dua dosis terbagi dapat menurunkan tingkat stress oksidatif serta berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Vivi NF, Safari WJ (2020) dan Haris RA, *et al* (2016) menyatakan bahwa pemberian kopi sebanyak 0,162 g/200gBB dan 1 ml/KgBB dapat meningkatkan jumlah, motilitas, dan morfologi spermatozoa.

Berdasarkan uraian diatas peneliti tertarik untuk meneliti tentang pemberian ekstrak Kopi Robusta Lampung terhadap motilitas, morfologi, dan jumlah spermatozoa tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan galur Sparague-dawley yang telah diinduksi MSG.

1.2 Rumusan masalah

Dari latar belakang diatas, maka dapat disusun rumusan masalah yaitu, bagaimana pengaruh pemberian ekstrak Kopi Robusta (*Coffea canephora*) Lampung terhadap morfologi, motilitas, dan jumlah spermatozoa tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan galur Sparague-dawley yang telah diinduksi MSG?

1.3 Tujuan penelitian

1.3.1 Tujuan umum

Tujuan umum dari penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak Biji Kopi Robusta (*Coffea canephora*) Lampung peroral terhadap jumlah, motilitas, dan morfologi normal spermatozoa tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan galur Sparague-dawley yang diinduksi MSG.

1.3.2 Tujuan khusus

Adapun tujuan khusus penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Mengetahui pengaruh pemberian ekstrak Biji Kopi Robusta (*Coffea canephora*) Lampung peroral terhadap jumlah spermatozoa tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan galur Sparague-dawley yang diinduksi MSG.
2. Mengetahui pengaruh pemberian ekstrak Biji Kopi Robusta (*Coffea canephora*) Lampung peroral terhadap motilitas spermatozoa tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan galur Sparague-dawley yang diinduksi MSG.
3. Mengetahui pengaruh pemberian ekstrak Biji Kopi Robusta (*Coffea canephora*) Lampung peroral terhadap morfologi normal spermatozoa tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan galur Sparague-dawley yang diinduksi MSG

1.4 Manfaat penelitian

Manfaat dari penelitian ini adalah sebagai berikut:

1.4.1 Bagi Peneliti

Menambah ilmu pengetahuan yang dapat dipelajari dan digunakan di bidang kedokteran dasar.

1.4.2 Bagi Institusi

Sebagai bahan kepustakaan yang ada di lingkungan Fakultas Kedokteran Universitas Lampung.

1.4.3 Bagi Masyarakat

Meningkatkan pengetahuan masyarakat mengenai manfaat kopi yang memiliki efek protektif terhadap morfologi, motilitas, dan jumlah spermatozoa yang telah diinduksi MSG.

1.4.4 Bagi Penelitian Lain

Memberikan gambaran untuk mengembangkan penelitian ini mengenai efek protektif dari kopi.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Kopi Robusta

2.1.1 Klasifikasi Tanaman Kopi Robusta

Klasifikasi tanaman kopi Robusta (*Coffea canephora*) dalam tata nama tumbuhan adalah sebagai berikut:

Kingdom	: Plantae
Divisi	: Tracheophyta
Kelas	: Magnoliopsida
Ordo	: Gentianales
Famili	: Rubiaceae
Genus	: <i>Coffea</i>
Spesies	: <i>Coffea canephora</i>

(*Integrated Taxonomic Information System, 2021*).

Luas lahan Perkebunan Rakyat (PR) meningkat menjadi 1,2215 juta hektar pada tahun 2019. Adapun luas areal perkebunan kopi di Lampung adalah 157 ribu hektar dengan jumlah produksi sebesar 110 ribu ton. Produksi kopi terbanyak terdapat pada bulan Juli sebesar 26 ribu ton (Badan Pusat Statistik, 2019).

Penyebaran kopi robusta di Indonesia relative luas karena dapat tumbuh dengan baik pada daerah dengan ketinggian rendah. Kopi Robusta dapat tumbuh optimal pada ketinggian 400-1000 m dpl dengan suhu udara 21-24°C. Adapun curah hujan yang sesuai untuk tanaman kopi yaitu 2000-3000 mm per tahun diikuti rerata bulan

kering yaitu 1-3 bulan dengan harus masih ada hujan (Purwanto dkk, 2020). Berdasarkan wilayah pengembangannya, sentra penghasil kopi Robusta terletak di Provinsi Sumatera Selatan, Lampung, Bengkulu, Jawa Timur, Jawa Tengah, Bali, Nusa Tenggara Timur, dan Nusa Tenggara Barat (Aklimawati L, 2014). Sementara di Provinsi Lampung sendiri, Kabupaten Lampung Utara ialah salah satu daerah pusat penghasil kopi robusta nasional yang dibudidayakan pada daerah dataran rendah sekitar <700 mdpl (Rusli, et al., 2015).

Kopi robusta memiliki karakteristik fisik biji agak bulat, lengkungan tebal, dan garis tengah dari atas kebawah hampir rata serta memiliki daun yang lebar dan tipis. Kopi ini juga memiliki kafein yang tinggi dan memiliki rasa yang cenderung pahit (Rukmana, 2014).



Gambar 1. Perbandingan Biji Kopi Arabika dengan Biji Kopi Robusta (Abduh, 2018).

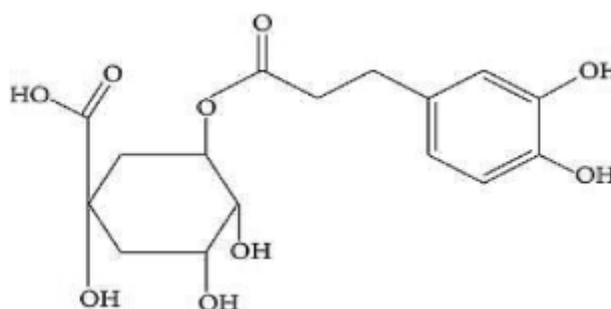
Keunggulan kopi robusta bila dibandingkan dengan kopi arabika yaitu, tanaman ini lebih tahan terhadap penyakit karat daun. Selain itu, pemeliharaannya juga lebih mudah dan sederhana yang menjadikan kopi robusta lebih banyak diminati oleh petani untuk dibudidayakan (Rusli et al., 2015).

2.1.2 Kopi Sebagai Antioksidan

Biji kopi robusta memiliki senyawa alkaloid, tannin, saponin, dan polifenol. Senyawa polifenol yang paling banyak terkandung pada kopi adalah asam klorogenat yang mencapai 90% dari total fenol yang terdapat pada kopi. Adapun asam klorogenat yang terkandung dalam biji kopi robusta adalah 9 g/100 g. Asam klorogenat ini dihasilkan

melalui proses ekstraksi, fraksinasi, dan isolasi yang berperan menghambat pertumbuhan Cell-Lines Hep-G2 melalui reaksi oksidasi-reduksi yang dapat menurunkan aktifitas *Reactive Oxygen Spesies* (ROS). Kemudian setelah terjadi penurunan aktifitas ROS, aktifitas *Mitogen-activated protein kinase* (MAPK) juga akan ikut menurun, lalu menurunkan aktifitas cFos-cJun yang juga akan menurunkan aktifitas *Cyclin-dependent Kinase* (CDK) 4 dan 6 sehingga terjadi penghambatan fase G1 dan terjadilah apoptosis akibat supresi onkogen (Herawati H, Asep S, 2013).

Setelah melakukan pengujian aktivitas antioksidan dengan metode DPPH, didapatkan hasil berupa nilai EC₅₀ yang dihasilkan oleh kafein sebesar 21,41 ppm. Sedangkan asam klorogenat sebesar 5,86 ppm. Nilai EC₅₀ ialah indikator yang menunjukkan aktivitas antioksidan yang memberikan penghambatan 50%. Semakin kecil nilai EC₅₀, maka semakin besar aktivitas antioksidannya. Sehingga dapat disimpulkan bahwa asam klorogenat mempunyai aktivitas antioksidan lebih tinggi dari pada kafein. Dapat terlihat juga dari banyaknya gugus hidroksil asam klorogenat dibanding kafein (Farhaty N dan Muchatridi, 2016). Berikut struktur kimianya



Gambar 2. Struktur Kimia Asam Klorogenat (Naveed et al., 2018)

Asam klorogenat adalah senyawa yang termasuk kedalam komponen fenolik yang bersifat larut dalam air dan terbentuk dari esterifikasi asam quinic dan asam transcinamic. Asam klorogenat dapat

berfungsi sebagai antioksidan, antivirius, hepatoprotektif dan berperan dalam antispasmodik (Farhaty N dan Muchatridi, 2016).

Biji kopi hijau robusta memiliki konsentrasi kandungan asam klorogenat tertinggi dibandingkan dengan biji kopi arabika, yaitu 6,1-11,3 g/100g. Setelah dilakukan penyangraian didapatkan konsentrasi asam klorogenat pada biji kopi robusta adalah 3,3-3,8 g/100g. hal ini disebabkan karena melalui proses penyangraian, asam klorogenat akan terurai menjadi derivat fenol sehingga konsentrasinya dalam biji kopi dapat berkurang (Farhaty N dan Muchatridi, 2016).

Efek repro-protektif asam klorogenat sebagai antioksidan dapat mencegah kerusakan akibat stress oksidatif sehingga meningkatkan fungsi sel interstitial dan dapat meningkatkan produksi testosteron. Asam klorogenat juga dapat meningkatkan jumlah jumlah, motilitas, dan morfologi sperma. Selain itu, sebagai anti-inflamasi, asam klorogenat juga dapat menurunkan kadar sitokokin inflamasi IL-1 β dan TNF- α yang dapat menyebabkan kerusakan pada testis (El-Khadragy *et al.*, 2021)

Pada penelitian yang dilakukan oleh pada penelitian yang dilakukan oleh Dja'fara dkk (2015) terjadi peningkatan konsistensi, motilitas, dan morfologi pada spermatozoa tikus wistar yang telah diberikan 80 mg larutan kopi. Selain itu pada penelitian yang dilakukan oleh Hartono *et al.*, (2016) didapatkan bahwa motilitas spermatozoa tikus wistar akan meningkat yang diberikan 180mg/3ml-360mg/3ml. Hal di atas juga kembali ditegaskan dalam penelitian yang dilakukan oleh Haris *et al.*, (2016) kembali menegaskan bahwa terjadi peningkatan konsentrasi, motilitas, dan morfologi spermatozoa setelah pemberian kopi dengan dosis >1ml/KgBB. Pada penelitian yang dilakukan oleh Mulyono *et al.*, (2020) pemberian kopi dengan dosis 52 mg/0,5 ml dan 78 mg/0,5 ml yang setara dengan 2 dan 3 cangkir kopi dan

mengandung 200 ml air dan 10 g bubuk kopi, terbukti dapat meningkatkan motilitas dan morfologi normal spermatozoa.

2.1.3 Penyangraian, Penyeduhan, dan Ekstraksi Biji Kopi Robusta

Lampung

Proses penyangraian menyebabkan perubahan pada biji kopi hijau yang tampak pada warna, bentuk, pH, aroma, dan rasa (Vignoli *et al.*, 2015). Saat penyangraian, biji kopi hijau akan dipanaskan dengan suhu tinggi dan waktu yang berbeda tergantung dari karakteristik produk akhir yang diinginkan (Aliah *et al.*, 2015).

Tingkat penyangraian kopi diklasifikasikan menjadi sangrai cukup (*light roast*), sangrai sedang (*medium roast*), dan sangrai matang (*dark roast*) yang dipengaruhi oleh durasi dan suhu saat dilakukan penyangraian serta biasanya dinilai secara kualitatif berdasarkan tampak warna biji kopi selama proses penyangraian (Vignoli *et al.*, 2014). Tingkat sangrai cukup (*light roast*) dilakukan selama 6-7 menit dengan menggunakan suhu 205-210°C. Tingkat sangrai sedang (*medium roast*) dilakukan selama 6-7 menit dengan menggunakan suhu 210-215°C. Tingkat sangrai matang (*dark roast*) dilakukan selama 6-7 menit dengan menggunakan suhu 215-220°C (Herawati *et al.*, 2019).

Semakin rendah suhu penyangraian yang digunakan, semakin besar kapasitas antioksidan yang dikandungnya. Tahapan *first crack* didefinisikan sebagai suara letupan dari biji kopi selama penyangraian serta ditentukan sebagai tingkat penyangraian yang penting untuk menghasilkan biji kopi sangrai dengan konsentrasi fenolat yang tinggi seperti asam klorogenat. Proses penyangraian menyebabkan penurunan aktivitas antioksidan pada kopi terkait dengan penurunan konsentrasi asam klorogenat seiring dengan peningkatan tingkat penyangraian (Herawati *et al.*, 2019; Vignoli *et al.*, 2014).

Salah satu isomer asam klorogenat yang juga berperan sebagai antioksidan, ialah 5-O-caffeoylquinic acid (5-CQA). Setelah proses penyangraian *light roast*, *medium roast*, dan *dark roast* kandungan 5-CQA dalam biji kopi robusta secara berurutan adalah 1,47 g/100g, 1,01 g/100g, 0,15 g/100g (Ilham N, 2020).

Penyeduhan kopi merupakan proses bercampurnya bubuk kopi dan air yang akan menghasilkan larutan kopi yang dapat diminum. Suhu ideal yang digunakan dalam proses penyeduhan kopi adalah 90-96°C.. selanjutnya dapat dilakukan pengadukan merupakan suatu tindakan paksaan secara manual ataupun mekanis sehingga terjadi kontak antara semua partikel bubuk kopi dan air penyeduh berlangsung secara intensif (Rahmawati dan Fibrianto, 2018).

Larutan bubuk kopi robusta didapatkan dari seduhan 5 gram bubuk kopi dengan 100 ml air mendidih 95°C dan diaduk dengan pengaduk selama 1 menit. Kandungan 5-CQA pada larutan bubuk kopi robusta yang telah diseduh dari biji kopi robusta dengan tiga tingkatan penyangraian yaitu *light roast*, *medium roast*, dan *dark roast* secara berurutan adalah 1,68 g/100g, 0,90 g/100g, dan 0,54 g/100g (Herawati *et al.*, 2019).

Ekstraksi adalah suatu proses perpindahan zat atau bahan terlarut dari larutan asal atau perpindahan padatan ke dalam pelarut tertentu. Ekstraksi juga dapat disebut sebagai proses pemisahan bahan dari campurannya dengan menggunakan pelarut yang sesuai (Amri aji *et al.*, 2017)

Langkah pertama pembuatan ekstrak biji kopi robusta (*Coffea canephora*) adalah memblender biji kopi robusta kering hingga menjadi serpihan kecil lalu menumbuknya sampai halus. Kemudian melakukan penimbangan sebanyak 300 gram dengan neraca timbang dan dimaserasi dalam larutan etanol 96% sebanyak 1200 ml selama 24 jam

dengan menggunakan *shaker bath*. Kemudian melakukan penyaringan dengan pompa vakum dan pemekatan dengan *rotary evaporator* sehingga diperoleh ekstrak pekat dengan konsentrasi 100%. Pembuatan sediaan ekstrak konsentrasi 50% yaitu dengan mencampurkan 1 ml sediaan 100% dengan 1 ml aquades. Sediaan ekstrak konsentrasi 25% dibuat dengan mencampurkan 1 ml sediaan 50% dengan 1 ml aquades (Yaqin dan Nurmilawati, 2015).

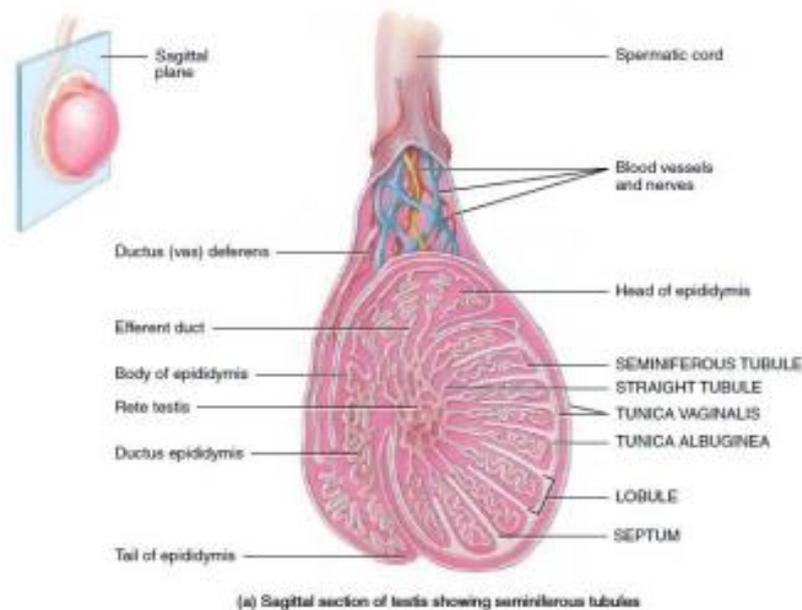
2.2 Anatomi Testis

Testis merupakan kelenjar berbentuk oval yang berpasangan dan terletak di dalam skrotum, berukuran 5 cm (2,5 inci) dengan diameter 2,5 cm (1 inci). Masing-masing testis memiliki massa 10-15 gram (Tortora, 2014).

Dalam masa perkembangannya, awalnya testis berkembang didekat ginjal, pada bagian belakang perut, lalu mulai turun ke skrotum melalui saluran inguinal biasanya selama paruh kedua bulan ketujuh perkembangan janin (Tortora, 2014). Akibat perpindahan testis dari dinding abdomen, setiap testis membawa satu kantung serosa yang disebut tunika vaginalis yang berasal dari peritoneum. Tunika vaginalis ini terdiri atas lapisan parietal pada bagian luar dan lapisan visceral pada bagian dalam yang membungkus tunika albuginea pada sisi anterior dan lateral testis (Mescher, 2016)

Testis dikelilingi kapsul jaringan ikat kolagen tebal (tunika albuginea) yang mengalami perluasan membentuk septum jaringan ikat tipis memanjang dari mediastinum testis dan membagi setiap testis sekitar 250 lobulus testis, masing-masing terdiri dari satu sampai empat tubulus seminiferus yang merupakan tempat berlangsungnya proses spermatogenesis (Eroschenko, 2015). Tubulus seminiferus ini dilapisi oleh epitel germinal berlapis serta mengandung dua jenis sel, yaitu sel spermatogenik yang merupakan sel pembentuk sperma dan sel sertoli yang berperan dalam proses spermatogenesis. Sel spermatozoa yang diproduksi di tubulus seminiferus akan

disimpan dan mengalami pematangan di epididimis. Setelah mengalami pematangan, sel spermatozoa akan menuju vas deferens (Mescher, 2016).



Gambar 3. Potongan sagittal testis (Tortora, 2014)

Testis dari tikus jantan terdapat pada dua kantung skortum yang dipisahkan, oleh membran tipis yang terletak antara anus dan preputium (Wuwungan, de Queljoe and Wewengkang, 2017). Tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang tepat untuk dijadikan sebagai hewan model penelitian sistem reproduksi adalah yang berumur 8-9 minggu sebab konsentrasi spermatozoa meningkat, terjadi pergerakan progresif, dan viabilitas mendekati 100% (Fitria L dkk, 2015)

2.3 Fisiologi

2.31 Spermatogenesis

Spermatogenesis adalah proses terbentuknya spermatozoa dari spermatogonium. Sel germinativum primordial (spermtogonium) dengan 46 kromosom (diploid) akan berproliferasi menjadi spermatozoa yang sangat khusus dan motil dan masing-masing mengandung set haploid 23 kromosom yang terdistribusi secara acak (Sherwood, 2015). Selama pembentukan embrio, sel germinal primordial bermigrasi kedalam testis dan menjadi sel germinal imatur

yang disebut spermatogonia yang terletak dua atau tiga lapisan permukaan dalam tubulus seminiferus. Spermatogonia mulai mengalami pembelahan mitosis saat pubertas, dan terus berproliferasi dan berdiferensiasi melalui berbagai tahap perkembangan untuk membentuk sperma (Guyton, 2014).

Pertama-tama, spermatogonia mengalami mitosis dan akan bermigrasi di antara sel-sel sertoli menuju lumen sentral tubulus seminiferus. Kemudian sel-sel sertoli akan mengelilingi spermatogonia yang sedang berkembang menuju bagian tengah lumen tubulus (Guyton, 2014). Setelah bermitosis spermatogonia akan membentuk spermatosit primer (46 kromosom). Setelah pembelahan mitotik terakhir, spermatosit primer masuk ke fase istirahat ketika kromosom-kromosom terduplikasi dan untai-untai rangkap tersebut tetap menyatu sebagai persiapan untuk pembelahan meiosis pertama (Tortora, 2014).

Setiap spermatosit tersebut, selanjutnya akan mengalami pembelahan meiosis I membentuk dua spermatosit sekunder (23 kromosom haploid). Setiap kromosom dalam spermatosit sekunder masih memiliki dua kromatid dari masing-masing kromosom. Selanjutnya, setelah 2-3 hari, terjadilah meiosis II, dimana spermatosit sekunder membelah menjadi dua spermatid yang mengandung 2 pasang 23 kromosom yang disebut spermatid dan kemudian dimodifikasi menjadi spermatozoa (sperma). Oleh karena itu, spermatosit primer menghasilkan empat spermatid melalui dua putaran pembelahan sel, yaitu meiosis I dan meiosis II. Keseluruhan proses spermatogenesis dari sel germinal sampai sperma membutuhkan waktu sekitar 65-75 hari (Tortora, 2014).

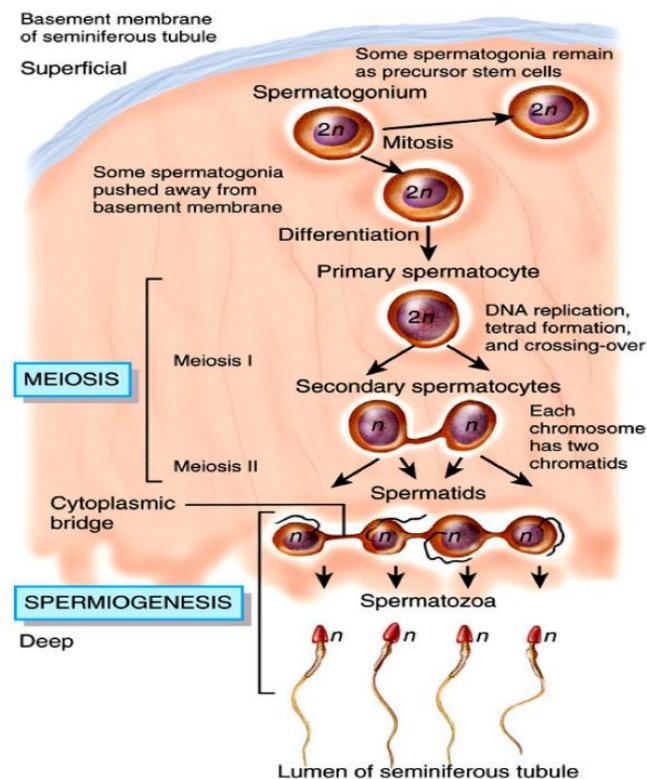


Figure 28.05 Tortora - PAP 12/e
Copyright © John Wiley and Sons, Inc. All rights reserved.

Gambar 4. Spermatogenesis (Tortora, 2014)

Pada manusia, Waktu yang diperlukan untuk pembentukan spermatogonia 3 hari, spermatosit primer selama 16 hari, spermatosit II 26 hari, spermatid 36 hari dan spermatozoa 49 hari. Kemudian spermatozoa yang terbentuk di dalam testis disalurkan ke saluran epididimis untuk mengalami proses pematangan (Susetyarini, 2015). Sedangkan tikus, waktu yang dibutuhkan untuk satu siklus spermatogenesis adalah 48 hari yang terdiri dari tiga jenis spermatogonia, yaitu spermatogonia A yang terdiri dari sel gelap yang tidak aktif membelah dan sel pucat yang aktif membelah dan berasal dari sel gelap, intermedia, dan B yang berasal dari tipe A dan akan menyelesaikan spermatogenesis (Akbar, 2010).

2.3.2 Spermiogenesis

Spermiogenesis adalah proses pematangan sperma, dimana spermatid akan berdiferensiasi menjadi spermatozoa. Selama proses ini tidak ada pembelahan sel yang terjadi, setiap spermatid menjadi sel sperma tunggal. spermatid yang berbentuk spheris berubah menjadi memanjang dan ramping. Akrosom terbentuk di atas nukleus, sebuah flagellum berkembang, dan mitokondria juga berkembang serta hilangnya sebagian besar sitoplasma. Selanjutnya, cairan yang disekresikan sel-sel penyokong mendorong sperma di sepanjang jalan mereka, menuju saluran testis. Pada titik ini, sperma belum bisa berenang (Tortora, 2014).

Spermatozoa memiliki empat bagian, yaitu: kepala, akrosom, badan, dan ekor. Kepala terutama terdiri dari nukleus, yang mengandung informasi genetik sperma (Sherwood, 2015). Di bagian luar, dua pertiga anterior kepala terdapat selubung tebal yang disebut akrosom. Selubung ini mengandung sejumlah enzim yaitu hialuronidase untuk mencerna filamen proteoglikan jaringan dan enzim proteolitik untuk mencerna protein. Enzim ini juga berperan untuk sperma dalam memasuki ovum dan membuahnya (Guyton dan Hall, 2014).

Spermatozoa pada tikus lebih panjang dibandingkan dengan spesies mamalia lainnya yang panjangnya sekitar 150-200 μm dengan kepala sperma berbentuk kail. Adapun produksi spermatozoa tikus setiap hari per testis adalah $35,4 \times 10^6/\text{mL}$ (Wuwungan, de Queljoe dan Wewengkang, 2017).

2.3.3 Pengaruh Hormon dalam Spermatogenesis

Proses spermatogenesis dipengaruhi oleh beberapa hormon diantaranya, *follicle-stimulating hormone* (FSH) dan *luteinizing hormone* (LH). Sekresi FSH dan LH dari hipofisis anterior dirangsang oleh satu hormon hipotalamus, *gonadotropin-releasing hormone* (GnRH).

Jumlah sekresinya dipengaruhi oleh inhibin yang dihasilkan sel sertoli dan testosteron. Hormon peptida inhibin dari testis yang dikeluarkan oleh sel sertoli berfungsi secara langsung menghambat sekresi FSH pada hipofisis anterior. Sedangkan, testosteron bekerja secara umpan balik negatif untuk menghambat sekresi LH dengan mengurangi pelepasan GnRH di hipotalamus. Secara tidak langsung mengurangi pengeluaran FSH dan LH oleh hipofisis anterior dan bekerja secara langsung untuk mengurangi responsivitas sel sekretorik LH terhadap GnRH. FSH bekerja pada tubulus seminiferus, khususnya sel sertoli, untuk meningkatkan spermatogenesis sedangkan LH bekerja pada sel leydig untuk mengatur sekresi testostero (Sherwood, 2015).

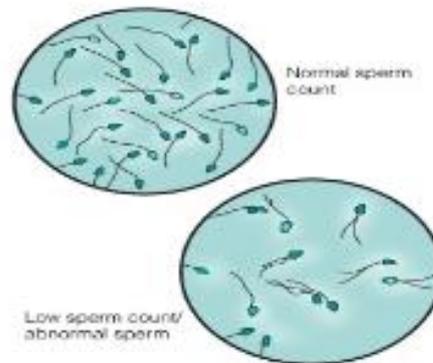
Penurunan pembentukan FSH menyebabkan penurunan jumlah sel sertoli yang akan mengganggu proses spermatogenesis sebab zat-zat yang dibutuhkan saat proses spermatogenesis juga terganggu, seperti nutrisi, faktor pertumbuhan, laktat, dan transferin. Adapun penurunan stimulasi LH pada sel leydig mengakibatkan penurunan produksi hormon testosteron sehingga menghambat spermatogenesis dan menyebabkan turunnya bobot testis (Saputra, Sitasiwi and Saraswati, 2020).

2.3.4 Jumlah Spermatozoa

Infertilitas dapat didefinisikan sebagai ketika jumlah sperma dalam setiap millimeter turun kira-kira dibawah 20 juta atau biasa disebut oligospermia (Guyton, 2014). Jumlah sel spermatozoa pada tikus normal yaitu berkisar antara 300 sampai 400 juta (Saputra, Sitasiwi and Saraswati, 2020). Selain itu juga terdapat kelainan sperma berupa azoospermia yang merupakan tidak adanya sel sperma saat ejakulasi (Kumar, 2011).

Abnormalitas sperma dapat disebabkan oleh berbagai faktor, seperti adanya cacat bawaan lahir, penyakit seperti varikokel, infeksi gonorea

atau infeksi virus human-papilloma, usia yang mana dengan bertambahnya usia dapat mempengaruhi jumlah dan motilitas sperma, paparan kimia, dan kebiasaan gaya hidup berupa stress dapat mengurangi jumlah sperma (Kumar, 2011)



Gambar 5. Jumlah Spermatozoa (Kumar 2011)

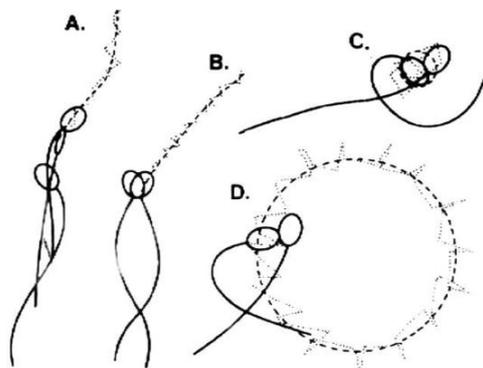
2.3.5 Motilitas Spermatozoa

Motilitas pada spermatozoa dihasilkan oleh flagel atau ekor melalui interaksi antara mikrotubulus, ATP, dan dinein (Sherwood, 2015).

Sperma normal cenderung bergerak lurus dengan gerakan ekor maju-mundur daripada memutar pada kecepatan 1 sampai 4 mm/menit hingga dapat bergerak mencapai ovum. Motilitas spermatozoa dikategorikan normal apabila pergerakan aktif didapatkan $>50\%$; pergerakan lemah didapatkan $<30\%$; dan tidak bergerak didapatkan $<20\%$. Sehingga jika ditotal (motilitas progresif + nonprogresif) didapatkan hasil 40% (Mulyono *et al.*, 2021)

Abnormalitas pada motilitas spermatozoa disebut sebagai athenospermia, yang ditandai dengan terjadinya perlambatan maupun pergerakan sperma yang tidak lurus serta sulitnya sperma untuk menembus ovum. Hal ini dapat disebabkan oleh kurangnya energi yang dihasilkan mitokondria, banyaknya zat koagulasi dalam semen hingga dapat menghalangi pergerakan spermatozoa atau kerusakan struktur

ekor sebagai alat gerak selain itu, banyak faktor yang memengaruhi persentasi motil, yaitu lama waktu di epididimis, morfologi, fisiologi, biokimia spermatozoa, flagella, aglutinasi, antibodi, kekentalan, pH, temperatur, cairan atau sekret, dan imunologi (Erris, Irma Harahap, 2014) Berikut adalah tingkatan dalam motilitas spermatozoa:



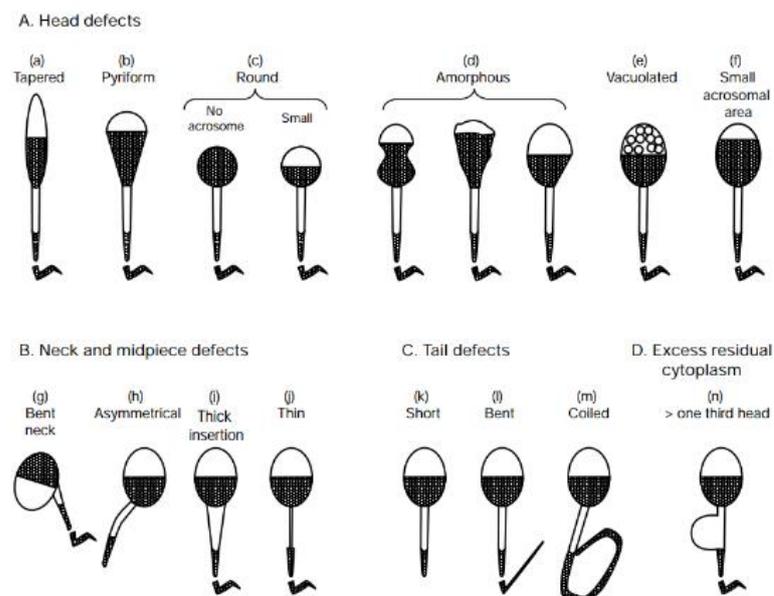
Gambar 6. Motilitas Spermatozoa (Susilawati, 2011)

2.3.6 Morfologi Spermatozoa

Spermatozoa memiliki panjang sekitar 60 mikrometer, yang terdiri dari kepala, badan, dan ekor. Kepala spermatozoa umumnya berbentuk oval agak runcing dengan Panjang 4-5 mikrometer. Kemudian pada 2/3 anteriornya terdapat badan atau biasa disebut akrosom. Dan yang terakhir adalah ekor. Ekor sperma terbagi menjadi empat bagian, yaitu leher, *middle piece*, *principal piece*, dan *end piece*. Leher adalah daerah di belakang kepala yang mengandung sentriol. *Middle piece* berisi mitokondria yang tersusun spiral, yang menyediakan energi (ATP) untuk pergerakan sperma ke tempat pembuahan dan metabolisme sperma. *Principal piece* adalah bagian terpanjang dari ekor, dan *end piece* adalah bagian terminal, bagian lonjong dari ekor (Tortora, 2014).

Struktur spermatozoa normal pada tikus yaitu memiliki bentuk kepala seperti kait pancing dan ekor lurus panjang, sedangkan spermatozoa abnormal mempunyai bentuk kepala tidak beraturan atau terlalu bengkok dan ekornya tidak lurus bahkan tidak berekor (Saputra, Sitasiwi and Saraswati, 2020).

Adapun abnormalitas pada morfologi sperma dapat disebut sebagai teratospermia, yang ditandai dengan adanya kelainan pada bentuk dan struktur yang dapat terlihat pada kepala, badan, atau ekor sperma (Hatta, 2016).

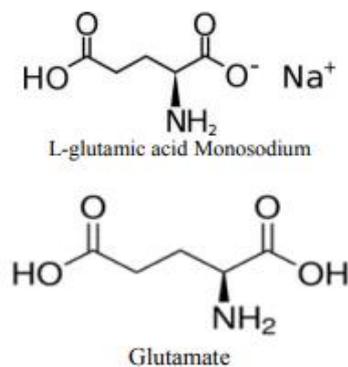


Gambar 7. Abnormalitas Morfologi Spermatozoa (Hatta, 2016)

2.4 Monosodium Glutamat

2.4.1 Definisi Monosodium Glutamat

Monosodium glutamat (MSG) adalah garam monosodium dari asam glutamate yang dapat muncul secara alamiah dari daging (contoh: daging sapi, ayam, dan babi), sayur (contoh: tomat, kentang, kol, jamur, wortel, kedelai, dan teh hijau), makanan laut (contoh: ikan, rumput laut, tiram, udang, kepiting, dan kerrang), buah (contoh: alpukat, apel, anggur, dan kiwi), dan susu (contoh: susu sapi, kambing, dan keju) dalam bentuk L-asam glutamat yang dideskripsikan sebagai rasa gurih/umami (Kaushalya & Jagath, 2017).



Gambar 8. Struktur Kimia MSG

Monosodium glutamat (berat molekul: 187.13) merupakan sebuah molekul yang dapat larut dalam air dan berbentuk serbuk kristalin putih. Dalam pH dan suhu tertentu, molekul MSG dapat berubah menjadi 5-pyrrodine-2-carboxylate. Selanjutnya dalam suhu yang lebih tinggi dan suasana basa, molekul MSG berubah menjadi D, L-glutamat. Konsentrasi palatabilitas yang ideal adalah 0,2% sampai 0,8%. Adapun dosis terbesar penggunaan MSG untuk manusia adalah 60mg/KgBB (Kaushalya & Jagath, 2017).

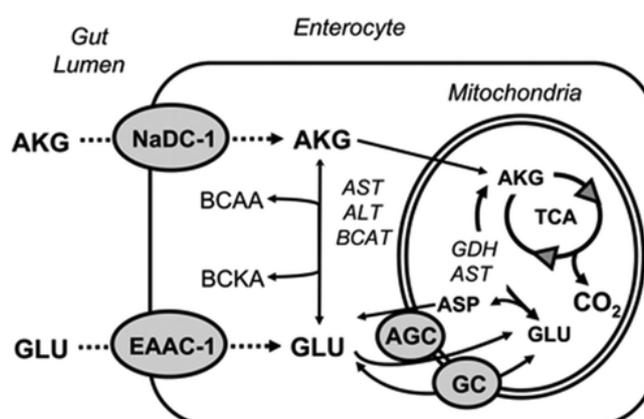
Penelitian tentang glutamat dalam bentuk L-asam glutamat pertama kali ditemukan oleh Karl Ritthausen pada tahun 1866, seorang ilmuwan asal Jerman, yang berasal dari hidrolisis gandum. Sedangkan garam monosodium yang berasal asam glutamate pertama kali ditemukan pada tahun 1908 oleh Profesor Kikunae Ikeda, seorang ilmuwan asal Jepang, yang mengidentifikasi rasa umami yang terdapat dalam sup rumput laut lalu mengklasifikasikannya sebagai lima rasa dasar selain rasa manis, asam, asin, dan pahit (Kaushalya & Jagath, 2017).

Pada 1960-an MSG menjadi sangat populer dan diproduksi melalui protein yang terhidrolisis, yaitu protein nabati, natrium kaseinat dan ragi yang terautolisis. Kemudian, pada tahun 1970 MSG mulai diproduksi melalui protein yang terdapat dalam sayuran dan ragi yang terautolisis dalam makanan bayi. Lalu pada tahun 2014, Asia

merupakan salah satu benua yang memproduksi MSG terbesar. Negara-negara tersebut adalah Tiongkok, Taiwan, Indonesia, Thailand, dan Vietnam. Tingginya konsumsi MSG dipengaruhi oleh perubahan pola diet, peningkatan urbanisasi dan kualitas hidup, serta berkembangnya industri makanan cepat saji. Namun di beberapa negara seperti Amerika, Mexico, dan Canada penggunaan MSG dibatasi akibat kasus obesitas yang kian meningkat (Kazmi *et al.*, 2017)

2.4.2 Metabolisme Monosodium Glutamat

Tubuh manusia mendapat glutamate yang berasal dari pencernaan makanan yang mengandung protein atau dari konsumsi makanan yang mengandung glutamat bebas baik secara alami maupun sintesis. Sebagian besar glutamat dimetabolisme di enterosit usus halus melalui transport aktif. Adapun transporter untuk glutamate adalah EAAC-1, GLT-1, dan GLAST-1. Katabolisme glutamate dimulai di sitosol dan mitokondria melalui proses transaminase dengan enzim *Aspartate Aminotransferase* (AST), *Alanin Aminotransferase* (ALT), rantai cabang Aminotransferase, dan *Glutamate Dehidrogenase* (GDH), yang menghasilkan α -ketoglutarat. Kemudian, α -ketoglutarat akan dimetabolisme menjadi karbon dioksida melalui siklus asam trikarboksilat, atom karbon yang tidak teroksidasi akan membentuk arginin, citrulin, alanin, dan ornitin, dan prolin lalu masuk ke sistem peredaran darah vena porta (Kazmi *et al.*, 2017).



Gambar 9. Siklus Metabolik Glutamat

Food and Agriculture Organization (FAO) dan World Health Organization (WHO) menyebutkan dosis harian MSG sekitar 120 mg/kgBB/hari (Munasiah M, 2020). Kementerian kesehatan menganjurkan untuk membatasi penggunaan MSG maksimal 1-2 sendok teh/hari dimana dalam 1 sendok teh setara dengan 4-6 gram (Kemenkes, 2018). Jika MSG dikonsumsi oleh seseorang yang tidak toleransi dengan jumlah lebih dari 3gr/hari makan akan dapat menimbulkan efek yang merugikan bagi kesehatan (Munasiah M, 2020)

2.4.3 Toksisitas Monosodium Glutamat

Pada penelitian yang telah dilakukan pada tikus yang diinjeksi MSG dengan dosis 4 mg/KgBB untuk mendeteksi adanya genotoksisitas ditemukan adanya peningkatan Malondialdehyde (MDA), penurunan kadar glutathion, serta peningkatan aktifitas enzim glutathion-S-transferase, yang merupakan tanda terjadinya stress oksidatif.

Penggunaan dosis MSG yang aman seperti yang dinyatakan oleh Food and Drugs Administration (FDA) adalah tidak lebih dari 3 g/hari.

Telah dilaporkan dari berbagai penelitian bahwa MSG dapat menyebabkan sebuah sindrom yang dikenal sebagai *Chinese Restaurant Syndrome* (CRS) atau *MSG symptom complex*. Sindrom ini muncul dalam 15-30 menit setelah konsumsi makanan yang berasal dari restoran china dan dapat bertahan selama 2 jam. Sindrom ini ditandai Gejala yang timbul akibat konsumsi MSG disebut dengan sindrom kompleks MSG. Gejala sindrom kompleks antara lain: rasa terbakar pada daerah leher bagian belakang menjalar ketangan dan dada, mati rasa pada daerah belakang leher, rasa kaku pada wajah, nyeri dada, mual, dan mengantuk (Munasiah M, 2020).

2.5 Pengaruh Monosodium Glutamat terhadap Testis

Produk akhir dari metabolisme MSG adalah glutamat. Reseptor dan transporter glutamat banyak terdapat di organ-organ reproduksi pria, yaitu testis, epididimis, vesikula seminalis, dan prostat. Tingginya kadar glutamat dapat mempengaruhi siklus asam trikarbosiklik sehingga dapat meningkatkan aktifitas alfa-ketoglutarat dehidrogenase. Hal ini dapat meningkatkan produksi *Reactive Oxygen Species* (ROS) sehingga terjadi stress oksidatif (Bilondatu, 2016).

Terikatnya glutamat pada reseptornya juga dapat meningkatkan masuknya Ca^{2+} ke dalam sel yang akan mengakibatkan kerusakan bahkan kematian sel Leydig dan sel sperma (Jubaidi *et al.*, 2019). Radikal bebas ini akan mengganggu proses spermatogenesis dan merusak membran spermatozoa sebab radikal bebas yang terbentuk akan mengakibatkan terjadinya peroksidasi lipid pada membran sel. Hal ini terjadi karena pada membran sel banyak terdapat asam lemak tak jenuh rantai ganda. Kemudian hal ini menyebabkan terganggunya integritas membran dan menginaktivasi ikatan membran dengan enzim dan reseptor. Dan akhirnya terjadi penurunan jumlah spermatosit dan spermatid (Bilondatu, 2016).

Terjadinya peroksidasi lipid juga dapat mengakibatkan perubahan morfologi dan peningkatan kolesterol testis yang menyebabkan terjadinya degenerasi sel gonad. Hal ini berakibat pada penurunan motilitas spermatozoa (Syahputra, Ichwan and Sufitni, 2019). Penurunan motilitas spermatozoa juga dapat diakibatkan oleh terjadinya penurunan produksi ATP pada mitokondria. Sehingga protein dinein yang terdapat pada aksonema yang tersusun sebagai alat gerak spermatozoa, tidak dapat menghidrolisis ATP dan menyebabkan terganggunya motilitas spermatozoa (Pebrianti, 2013).

Peningkatan kadar *Reactive Oxygen Species* (ROS) dapat menyebabkan rusaknya integritas DNA pada nucleus spermatozoa. Kerusakan ini kemudian

akan menyebabkan terjadinya apoptosis sel lalu mengakibatkan penurunan jumlah dan motilitas spermatozoa (Syahputra, Ichwan and Sufitni, 2019).

Selain itu, MSG dapat menimbulkan efek neurotoksin pada sistem Hipotalamus-Hipofisis-Gonad yang menyebabkan terjadinya penurunan hormon reproduksi yaitu *Gonadotropin Releasing Hormone* (GnRH). Hal ini dapat menyebabkan penurunan sekresi *Luteinizing Hormone* (LH) dan *Follicle-Stimulating Hormone* (FSH) yang sangat penting dalam proses spermatogenesis. Penurunan sekresi LH menyebabkan penurunan aktivitas sel leydig untuk memproduksi hormon testosteron sedangkan penurunan FSH akan menghambat produksi sperma sehingga jumlah spermatozoa juga menurun (Bilondatu, 2016).

Pada beberapa penelitian dengan hewan coba, pemberian MSG dengan dosis 4,8g/kgBB; 7,2g/KgBB; dan 9,6g/KgBB selama 20 hari secara peroral pada tikus jantan (*Rattus norvegicus*) dapat menurunkan kadar FSH dan LH (Edward Z, 2015). Selain itu pemberian MSG dengan dosis 6 g/KgBB selama 14 hari secara peroral pada tikus wistar jantan dapat menurunkan motilitas, menurunkan jumlah morfologi normal sperma dan menurunkan jumlah sel leydig (Kadir, 2011). Dan juga pemberian dosis MSG sebanyak 4 g/KgBB selama 10 hari secara peroral pada tikus jantan (*Rattus norvegicus*) dapat menurunkan jumlah spermatosit primer dan meningkatkan nekrosis sel spermatogenik (Mohamed, 2012).

Sedangkan ada penelitian yang dilakukan oleh Bilondatu, dkk (2016) didapatkan hasil bahwa, pemberian MSG pada kelompok perlakuan sesuai dosis konsumsi rata-rata di Indonesia (0,6 g/hari) kemudian dikonversikan sesuai berat badan tikus yang digunakan (200 g) sehingga didapatkan dosis MSG yang digunakan adalah 12,4 g/KgBB yang diberikan secara oral selama 20 dan 40 hari diperoleh gambaran mikroskopik sediaan testis tikus wistar yang berbeda dengan semua kelompok kontrol negatif, yakni didapatkan diameter tubulus semineferus yang lebih kecil, jumlah lapisan sel-sel

spermatogenik yang lebih sedikit dan kepadatan sel interstisial yang berkurang secara kualitatif (Bilondatu, 2016).

2.6 Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Galur Sparague-dawley

Rattus norvegicus memiliki beberapa keunggulan sehingga dipilih menjadi spesies hewan uji, yaitu Tikus putih memiliki perkembangbiakan yang cepat, ukuran yang lebih besar dibandingkan dengan mencit, mudah dipelihara dalam jumlah yang banyak, hewan pemakan segala, dan mempunyai jaringan yang hampir sama dengan manusia. Selain itu, *Rattus norvegicus* mempunyai 3 galur, yaitu *Sparague dawley*, *Wistar*, dan *Long evans*. Karakteristik galur *Sparague dawley* adalah memiliki tubuh yang ramping, kepala kecil, telinga tebal, dan pendek dengan rambut halus serta ukuran ekor yang lebih Panjang dari badannya (Frianto, Fajriaty and Riza, 2015). Adapun taksonominya sebagai berikut:

Kingdom	: Animalia
Filum	: Chordata
Kelas	: Mamalia
Ordo	: Rodenia
Famili	: Muridae
Genus	: Rattus
Spesies	: <i>Rattus norvegicus</i>

(Wolfenshon dan Lloyd, 2013).



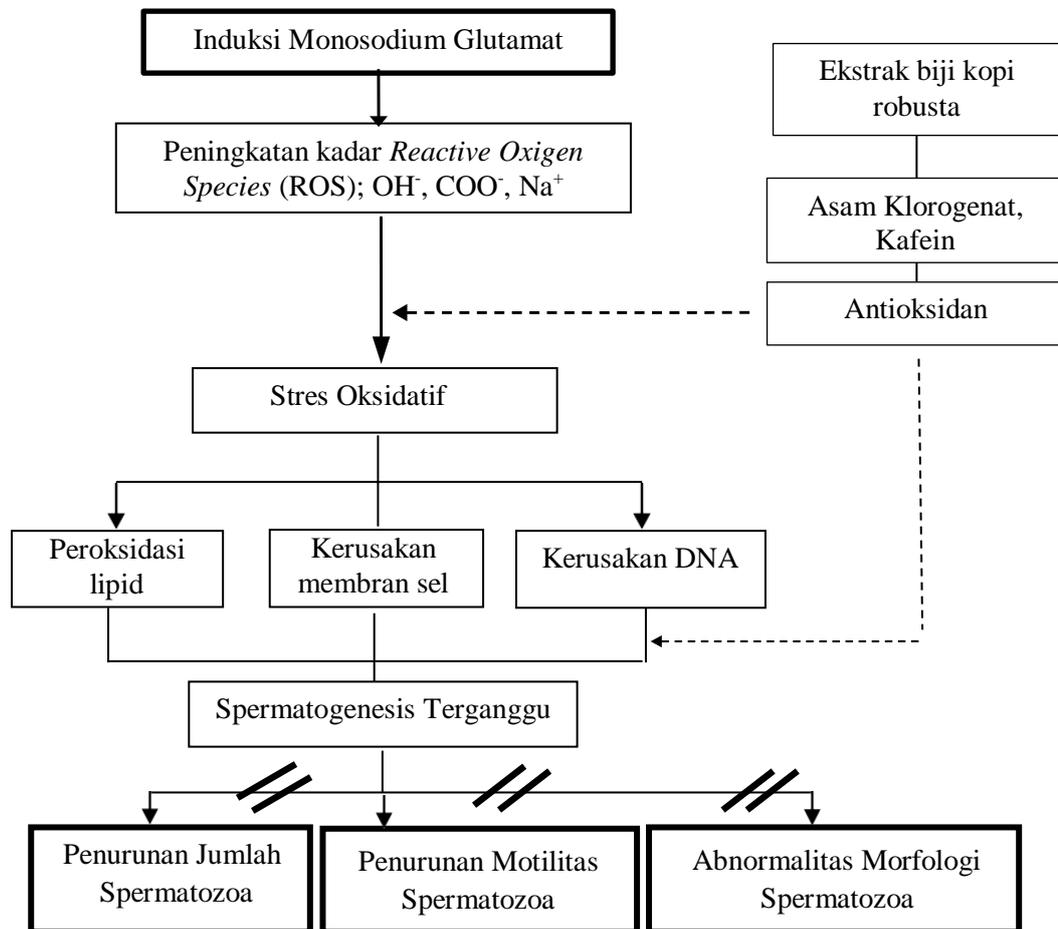
Gambar 10. Tikus putih (*Rattus norvegicus*) Galur Sparague-dawley
(Janvier Lab, 2013)

Berikut adalah data fisiologis tikus putih (*Rattus norvegicus*) (Wolfenshon dan Lloyd, 2013)

Tabel 1. Data Fisiologis Tikus Putih

Nilai Fisiologis	Kadar
Berat tikus dewasa	Jantan 150-500g Betina 150-325g
Kebutuhan makan	5-10g/100g berat badan
Kebutuhan minum	10ml/100g berat badan
Jangka hidup	3-4 tahun
Temperatur rektal	360°C-400°C
Detak Jantung	250-450 kali/menit
Tekanan Darah	84-134/60 mmHg
Volume Lambung	3-5ml
Laju Pernafasan	70-115 kali/menit
Serum Protein	5,6-7,6 g/dl
Albumin	3,8-4,8 g/dl
Glukosa	50-135 mg/dl
Nitrogen Urea Darah	15-21 mg/dl
Kreatinin	0,2-0,8 mg/dl
Total Bilirubin	0,2-0,55 mg/dl
Kolesterol	40-130 mg/dl

2.7 Kerangka Teori



Gambar 11. Kerangka Teori

Keterangan:

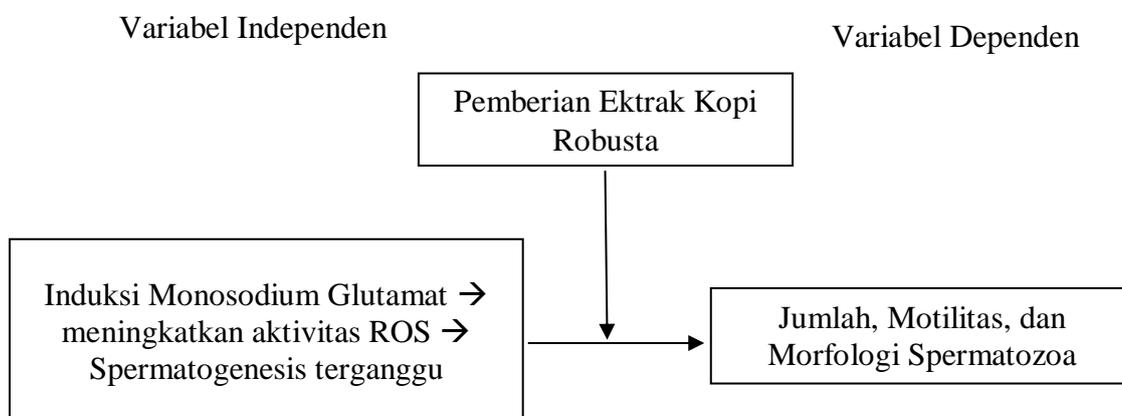
: Variabel yang diteliti

- - - - -> : Menghambat

/// : Mencegah

→ : Memengaruhi

2.8 Kerangka Konsep



Gambar 12. Kerangka Konsep.

2.9 Hipotesis

1. H₀

Tidak terdapat pengaruh pemberian ekstrak biji kopi robusta (*Coffea canephora*) Lampung secara oral terhadap peningkatan jumlah, motilitas, dan morfologi normal spermatozoa tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur Sprague-dawley yang diinduksi monosodium glutamat.

2. H_a

Terdapat pengaruh pemberian ekstrak biji kopi robusta (*Coffea canephora*) Lampung secara oral terhadap peningkatan jumlah, motilitas, morfologi normal spermatozoa tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur Sprague-dawley yang diinduksi monosodium glutamat.

BAB III METODE PENELITIAN

3.1 Jenis dan Desain Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan adalah penelitian eksperimental laboratorium. Desain penelitian menggunakan Rancangan Acak Lengkap dengan *Post-Test Only Control Group Design*. Dalam penelitian ini dilakukan randomisasi, yaitu sebelum diberikan perlakuan semua kelompok kontrol dan eksperimen dianggap sama sehingga pengelompokan kelompok kontrol dan eksperimen dilakukan secara acak. Pengambilan data dilakukan pada akhir penelitian setelah selesai diberi perlakuan dengan membandingkan kelompok eksperimen dengan kelompok kontrol.

3.2 Waktu dan Tempat Penelitian

3.2.1 Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan November 2021 – Maret 2022.

3.2.2 Tempat Penelitian

Pemeliharaan dan pemberian ekstrak biji kopi robusta (*Coffea canephora*)

lampung pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan dilaksanakan di *Animal House* Fakultas Kedokteran Universitas Lampung. Pembuatan ekstrak biji kopi robusta (*Coffea canephora*) lampung dilaksanakan di Laboratorium Kimia Organik Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung. serta pembuatan dan pengamatan preparat dilakukan di Laboratorium Biokimia, Fisiologi, dan Biologi Molekuler Fakultas Kedokteran Universitas Lampung.

3.3 Subyek Penelitian

3.3.1 Populasi

Populasi penelitian yang digunakan adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) dewasa jantan galur Sprague-dawley yang diperoleh dari Animal Vet Laboratorium Services Dramaga, Kabupaten Bogor, Jawa Barat.

3.3.2 Sampel

Sampel penelitian yang digunakan sebanyak 30 ekor tikus putih yang dipilih secara acak kemudian dibagi dalam 5 kelompok dengan masing-masing kelompok terdiri dari 6 ekor tikus.

Penentuan besar sampel untuk penelitian eksperimental ditentukan dengan menggunakan rumus Federer, yaitu sebagai berikut:

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

Keterangan:

n = jumlah ulangan

t = jumlah perlakuan

Penelitian ini akan menggunakan 5 kelompok sehingga perhitungan jumlah sampel setiap kelompok adalah sebagai berikut:

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

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

$$4(n - 1) \geq 15$$

$$4n - 4 \geq 15$$

$$4n \geq 19$$

$$n \geq 4,75$$

Dari hasil perhitungan di atas, jumlah sampel yang digunakan pada setiap kelompok adalah sebanyak 5 ekor tikus putih dan jumlah kelompok yang akan digunakan adalah 5 kelompok sehingga penelitian ini akan menggunakan 25 ekor tikus putih. Namun, untuk menghindari

terjadinya drop out atau kematian pada tikus putih maka ditambahkan tikus putih menggunakan rumus sebagai berikut:

$$N = \frac{n}{1 - F}$$

Keterangan:

N = besar sampel koreksi

n = besar sampel awal

f = perkiraan proporsi drop out sebesar 10%

$$N = \frac{5}{1 - 10\%}$$

$$N = \frac{1}{1 - 0,1}$$

$$N = \frac{5}{0,9}$$

$$N \approx 6 \quad (\text{pembulatan ke atas})$$

Dari hasil perhitungan di atas, besar sampel koreksi yaitu 6 tikus putih perkelompok sehingga diperlukan sampel tambahan sebanyak 1 ekor tikus putih pada setiap kelompok. Oleh karena itu, jumlah sampel keseluruhan yang digunakan pada penelitian ini adalah 30 ekor tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan galur Sprague-dawley dari populasi yang ada. Untuk pemilihan sampel, peneliti menggunakan teknik simple random sampling yaitu pemilihan sampel per kelompok secara acak dan sederhana. Prosedur dilakukan dengan memberi nomor pada ekor tikus dengan angka 1-30 di setiap kelompok secara acak dengan menggunakan spidol dan selanjutnya dikonversikan ke beberapa kode tertentu.

3.3.3 Kelompok Perlakuan

Sampel 30 ekor tikus putih jantan dewasa dibagi menjadi 5 kelompok sebagai berikut:

1. Kelompok Kontrol Negatif (K-): Kelompok tikus putih jantan dewasa yang diberi aquades dengan volume 3 ml dengan frekuensi satu kali sehari selama 14 hari secara peroral.
2. Kelompok Kontrol Positif (K2): Kelompok tikus putih jantan dewasa yang diinduksi MSG 4 g/KgBB dalam 3 ml aquades dengan frekuensi satu kali sehari selama 14 hari secara peroral.
3. Kelompok Perlakuan 1 (P1): Kelompok tikus putih jantan dewasa yang diinduksi MSG 4 g/KgBB dalam 2 ml aquades dan ekstrak biji kopi robusta (*Coffea canephora*) lampung 1 ml/200gBB/hari konsentrasi 0,006 g/ml dengan frekuensi satu kali sehari selama 14 hari secara peroral.
4. Kelompok perlakuan 2 (P2): Kelompok tikus putih jantan dewasa yang diinduksi MSG 4 g/KgBB dalam 2 ml aquades dan ekstrak biji kopi robusta (*Coffea canephora*) lampung 1 ml/200gBB/hari konsentrasi 0,012 g/ml dengan frekuensi satu kali sehari selama 14 hari secara peroral.
5. Kelompok perlakuan 3 (K3): Kelompok tikus putih jantan dewasa yang diinduksi MSG 4 g/KgBB dalam 2 ml aquades dan ekstrak biji kopi robusta (*Coffea canephora*) lampung 1 ml/200gBB/hari konsentrasi 0,024 g/ml dengan frekuensi satu kali sehari selama 14 hari secara peroral.

3.3.4 Kriteria Inklusi dan Eksklusi

Penelitian ini menggunakan tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan galur Sprague-dawley yang memiliki kriteria sebagai berikut:

1. Kriteria Inklusi

- a. Tikus putih *Rattus norvegicus* jantan galur Sprague-dawley.
- b. Sehat (gerak aktif, rambut tidak kusam, dan tidak rontok/botak)

- c. Berat badan 170-230 gram.
- d. Berusia sekitar 8-12 minggu

2. Kriteria Eksklusi

- a. Mengalami penurunan berat badan lebih dari 10% setelah masa adaptasi (1 minggu) di laboratorium
- b. Sakit selama diberi perlakuan yang ditandai dengan adanya penampakan rambut rontok atau botak, kusam, dan aktivitas kurang atau tidak aktif.
- c. Mati selam masa pemberian intervensi.

3.4 Identifikasi Variabel dan Definisi Operasional

3.4.1 Variabel Penelitian

1. Variabel bebas (*Independent Variable*)
 - a. Ekstrak Biji Kopi Robusta Lampung. Biji kopi yang digunakan untuk pembuatan ekstrak adalah biji kopi robusta yang diperoleh dari daerah Sumberjaya, Lampung Barat
 - b. Larutan Monosodium Glutamat 4 g/kgBB.
2. Variabel terikat (*Dependent Variable*)
 - a. Jumlah spermatozoa
 - b. Motilitas spermatozoa
 - c. Morfologi spermatozoa

3.4.2 Definisi Operasional Variabel Penelitian

Definisi operasional penelitian terdapat pada tabel berikut. Hal ini untuk memudahkan penjelasan dan memperlihatkan variabel-variabel yang terlibat dalam penelitian ini.

Tabel 2. Definisi Operasional

Variabel	Definisi operasional	Cara Ukur	Alat Ukur	Hasil Ukur	Skala Ukur
Jumlah spermatozoa	Konsentrasi spermatozoa yang terlihat dalam pengamatan		Improved Neubauer	Juta/ml	Numerik (Rasio)

Variabel	Definisi operasional	Cara Ukur	Alat Ukur	Hasil Ukur	Skala Ukur
Motilitas spermatozoa	<p>mikroskop dengan perbesaran 400x dalam 5 lapang pandang. Rumus: Jumlah spermatozoa = $n/\text{pengenceran} \times 10^6$ (juta/ml). (Alrizaldi <i>et al.</i>, 2021).</p> <p>Pergerakan spermatozoa yang terlihat bergerak progresif, pergerakan yang tidak progresif, atau tidak bergerak sama sekali diamati dibawah mikroskop dengan perbesaran 400x. Rumus: % motilitas = $n/N \times 100\%$ (Mulyono <i>et al.</i>, 2021).</p>		Mikroskop, kalkulator	Persentase spermatozoa motil dibandingkan dengan total spermatozoa yang diamati	Numerik (Rasio)
Morfologi spermatozoa	<p>Diamati bentuk 100 ekor spermatozoa pada perbesaran 400x dengan melihat <i>atlas of human sperm morphology evaluation</i>. Rumus: % morfologi = $n/N \times 100\%$ (Mulyono <i>et al.</i>, 2021)</p>	Menilai berdasarkan nilai referensi normal morfologi	Mikroskop	Persentase morfologi spermatozoa normal dibandingkan dengan seluruh spermatozoa yang teramati (normal dan abnormal).	Numerik (Rasio)
Monosodium glutamat	<p>Larutan MSG yang dibuat dengan cara melarutkan MSG dengan dosis 4 g/kgBB ke dalam aquades 3 ml sehingga didapatkan larutan MSG dengan dosis 4 g/kgBB/hari dan diinduksi secara peroral pada setiap hewan coba (Dong dan Robbins, 2015)</p>	Pengukuran konsentrasi larutan MSG dengan menggunakan gelas ukur	Neraca Analitik dan Gelas Ukur	Dosis MSG 4 g/KgBB/hari	Numerik (Rasio)
Ekstrak Kopi Robsuta	<p>Bubuk kopi robusta lampung yang diproses menjadi larutan ekstrak biji kopi robusta</p>	Pengukuran konsentrasi ekstrak biji kopi robusta lampung	Neraca Analitik dan Gelas Ukur	Kelompok Perlakuan diberi 1 ml/200gBB/ hari dengan konsentrasi:	Kategorik (Ordinal)

Variabel	Definisi operasional	Cara Ukur	Alat Ukur	Hasil Ukur	Skala Ukur
	lampung dengan dosis 1 ml/200gBB/hari konsentrasi 0,006 g/ml, 0,012 g/ml, dan 0,024 g/ml serta diberikan secara peroral pada setiap hewan coba (Mulyono <i>et al.</i> , 2020)	dengan menggunakan gelas ukur		P1= 0,006 g/ml P2= 0,012 g/ml P3= 0,024 g/ml	

3.5 Alat dan Bahan

3.5.1 Alat Penelitian

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini diantaranya:

1. Kandang tikus yang terbuat dari wadah plastik sebanyak 9 kandang
2. Penutup kandang tikus yang terbuat dari kawat sebanyak 9 penutup
3. Tempat makan
4. Botol minuman 60 ml
5. Sonde lambung
6. Spuit 1 cc, 3 cc, dan 5 cc
7. Gelas ukur 10 ml dan 100 ml
8. Batang pengaduk gelas
9. Rak tabung reaksi
10. Tabung erlenmeyer
11. Labu ukur 100 ml dan 250 ml
12. Neraca analitik
13. Handschoen
14. Tissue
15. Alat Bedah Minor
16. Cover Glass
17. Object Glass
18. Pisau
19. Mikroskop Cahaya

3.5.2 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini diantaranya:

1. Bahan Biologis: Tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan galur Sprague-dawley dengan berat 170-230 gram.
2. Bahan Kimia: Larutan monosodium glutamat dengan dosis 4 g/kgBB; Larutan ekstrak biji kopi robusta lampung dengan dosis 1 ml/200gBB/hari dengan konsentrasi 0,006g/ml, 0,012 g/ml, dan 0,024 g/ml.
3. Bahan Terminasi Tikus: Ketamine sebanyak 9 ml.

3.6 Prosedur Penelitian

3.6.1 Ethical clearance

Penelitian ini dimulai dengan mengajukan proposal *ethical clearance* ke Fakultas Kedokteran Universitas Lampung untuk mendapatkan izin etik penelitian menggunakan 30 ekor tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan dengan galur Sprague-dawley.

3.6.2 Pengadaan Hewan Uji

Hewan uji yang digunakan pada penelitian ini yaitu 30 ekor tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan galur Sprague-dawley yang dibeli dari *Animal Vet Laboratorium Services Dramaga*, Kabupaten Bogor, Jawa Barat.

3.6.3 Pemeliharaan Hewan Uji

Hewan uji yang digunakan pada penelitian ini adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan galur Sprague-dawley dewasa usia 8-12 minggu dengan berat rerata 170-230 gram dan sehat. Hewan uji ditempatkan pada kandang yang terbuat dari baskom atau wadah plastik yang diberikan alas dari sekam padi. Penggantian sekam padi perlu dilakukan setiap 3 hari sekali untuk menjaga kandang tetap bersih dan mencegah timbulnya penyakit infeksi akibat perkembangan mikroorganisme yang dapat mengganggu kelangsungan hidup hewan uji. Sebuah penutup

yang terbuat dari kawat ram diletakkan di bagian atas kandang (baskom) dan diletakkan botol tempat minum untuk hewan uji. Dalam 1 kelompok, 4 ekor tikus ditempatkan dalam 1 kandang. Makanan yang diberikan untuk hewan uji adalah pelet atau pakan ikan, sedangkan air minum yang diberikan berupa air putih yang diletakkan dalam botol plastik yang disumbat pipa aluminium. Makanan dan minuman diberikan secara ad libitum dan ditempatkan pada wadah terpisah serta diganti setiap 1 hari sekali. Kandang diletakkan di ruangan dengan suhu kamar dan terpapar sinar matahari secara tidak langsung agar kelembaban tetap terjaga dalam batas normal. Setiap tikus diberi perlakuan satu kali sehari selama 14 hari.

3.6.4 Aklimatisasi Hewan Uji

Hewan uji diadaptasikan selama 6 hari di Animal House Fakultas Kedokteran Universitas Lampung untuk menyeragamkan makanan dan cara hidup sebelum diberi perlakuan. Kesehatan hewan uji diperhatikan setiap hari seperti gerakan yang aktif dan tidak ada kerusakan pada tubuh hewan uji, kebersihan kandang, dan frekuensi pemberian makanan.

3.6.5 Pembagian Kelompok

Sampel pada penelitian ini dipilih secara acak dan dibagi menjadi 5 kelompok dengan masing-masing kelompok terdiri dari 6 ekor tikus putih jantan. Masing-masing kelompok tikus diletakkan di dalam kandang tersendiri dan dijaga sedemikian rupa sehingga tidak saling berinteraksi.

3.6.6 Pembuatan Larutan Monosodium Glutamat

Pemberian MSG dengan dosis 4 g/kgBB selama 14 hari telah terbukti dapat mengakibatkan penurunan jumlah, motilitas, dan morfologi normal spermatozoa pada tikus (Dong dan Robbins, 2015). Pembuatan larutan MSG dilakukan setiap 3 hari sekali. Larutan MSG dibuat

dengan cara melarutkan MSG dengan dosis 4 g/kgBB yang telah diukur dengan menggunakan neraca ke dalam aquades 3 ml dan diaduk sampai kristal MSG larut dengan aquades. Selanjutnya larutan MSG dimasukkan ke dalam botol kaca dan disimpan di tempat dingin.

3.6.7 Pengadaan Biji Kopi Robusta Lampung

Biji kopi robusta lampung diperoleh dari daerah Sumberjaya, Lampung Barat sebanyak 650 gram. Biji kopi robusta yang digunakan pada penelitian ini adalah biji kopi robusta green bean.

3.6.8 Penyangraian Biji Kopi Robusta Lampung

Biji kopi robusta yang digunakan pada penelitian ini adalah biji kopi robusta lampung green bean dan melalui proses penyangraian. Proses penyangraian biji kopi robusta lampung sebanyak 650 gram dilakukan dengan menggunakan alat *UncleJohn Roaster* di Kedai Kopi Flambojan Lampung untuk mendapatkan biji kopi robusta kering. Biji kopi robusta lampung disangrai dengan tingkat kematangan sangrai yaitu sangrai cukup (*light roast*) sampai saat terjadi first crack dengan suhu 201°C dan waktu penyangraian 11 menit. Tahapan first crack ditandai dengan terdengarnya suara letupan dari biji kopi (Herawati et al., 2019). Selanjutnya, biji kopi robusta digiling dan didapatkan bubuk kopi robusta yang ditimbang sebanyak 500 gram sebagai bahan pembuatan ekstrak biji kopi robusta lampung.

3.6.9 Penentuan Dosis Ekstrak Biji Kopi Robusta Lampung

3.6.9.1 Pembuatan Larutan Bubuk Kopi Robusta Lampung

Konsumsi kopi sebanyak 3-5 cups per hari pada manusia dapat berperan sebagai antioksidan dan memberikan perlindungan pada sistem reproduksi (Paula et al., 2019). Pada penelitian yang dilakukan oleh Mulyono et al menunjukkan bahwa dengan pemberian kafein pada tikus dengan dosis 78 mg/0,5 mL yang setara dengan dengan 3 cups kopi perhari selama 35 hari secara

per oral dapat meningkatkan motilitas dan morfologi normal sperma setelah pemberian bahan aktif *d-allethrin* (Mulyono et al., 2020). Pertama-tama dilakukan perhitungan penyesuaian dosis manusia terhadap tikus adalah sebagai berikut. Faktor konversi untuk manusia (70 kg) ke tikus (200 g) adalah 0,018 (Shah & Kumar, 2020). Perhitungan dosis kopi yang diberikan kepada 30 tikus putih jantan menyesuaikan kebutuhan manusia per hari adalah sebagai berikut.

$$1 \text{ cup} = 150 \text{ ml}$$

$$3 \text{ cups} = 450 \text{ ml}$$

Dosis kopi yang digunakan pada tikus putih jantan adalah volume kopi dikalikan dengan faktor konversi yaitu sebagai berikut.

$$\begin{aligned} \text{Dosis kopi tikus putih jantan} &= 450 \text{ ml} \times 0,018 \\ &= 8,1 \text{ ml}/200\text{gBB/hari} \end{aligned}$$

Perbandingan antara bubuk kopi dan air dalam 1 cup kopi ialah 8,25 g bubuk kopi untuk setiap 150 ml air (*Specialty Coffee Association*, 2018). Maka dalam 3 cups kopi memerlukan 24,75 g bubuk kopi untuk 450 ml air.

Pembuatan 3 cups kopi antara lain adalah sebagai berikut.

- a. Menentukan Volume Bubuk Kopi (Volume Zat Terlarut = Vzt)
- | | |
|-------------------------------|--|
| Takaran bubuk kopi 3 cups | = 24,75 gram |
| Jadi, massa bubuk kopi (m) | = 24,75 gram |
| Massa jenis kopi (ρ) | = 0,47 g/ml |
| Maka, Volume bubuk kopi (Vzt) | = m/ρ |
| | = $24,75\text{g}/0,47 \text{ g ml}^{-1}$ |
| | = 52,7 ml |

b. Menentukan Volume Air (Volume Zat Pelarut = V_{zp})

$$1 \text{ cup} = 150 \text{ ml}$$

$$3 \text{ cups} = 450 \text{ ml}$$

c. Menentukan Konsentrasi Larutan Bubuk Kopi

$$C = \frac{m}{(v_{zt} + v_{zp})}$$

$$C = \frac{24,75 \text{ g}}{(52,7 \text{ ml} + 450 \text{ ml})}$$

$$C = 0,05 \text{ g/ml}$$

Berdasarkan penghitungan tersebut, didapatkan konsentrasi 3 *cups* larutan bubuk kopi adalah 0,05 g/ml. Dalam pembuatan larutan bubuk kopi akan dihasilkan ampas kopi sehingga diperlukan tahapan ekstraksi.

3.6.9.2 Pembuatan Ekstrak Biji Kopi Robusta Lampung

Ekstraksi adalah suatu proses perpindahan zat atau bahan terlarut dari larutan asal atau perpindahan padatan ke dalam pelarut tertentu. Ekstraksi juga dapat disebut sebagai proses pemisahan bahan dari campurannya dengan menggunakan pelarut yang sesuai (Amri aji et al., 2017). Langkah pertama pembuatan ekstrak biji kopi robusta

(*Coffea canephora*) adalah memblender biji kopi robusta kering hingga menjadi serpihan kecil dan menumbuknya sampai halus. Kemudian melakukan penimbangan sebanyak 500 gram dengan neraca timbang dan dimaserasi dalam larutan etanol 96% sebanyak 2000 ml selama 24 jam dengan menggunakan *shaker bath*. Kemudian melakukan penyaringan dengan pompa vakum dan pemekatan dengan *rotary evaporator* selama 3-6 jam dengan suhu 41°C sehingga diperoleh ekstrak pekat kopi robusta lampung dengan konsentrasi 100% (Yaqin dan Nurmilawati, 2015).

Dari hasil pembuatan ekstrak biji kopi robusta lampung didapatkan ampas kopi sebanyak 480 gram sehingga perhitungan hasil ekstrak biji kopi robusta lampung adalah sebagai berikut.

Massa Biji Kopi Robusta	= 500 gram
Massa Ampas Kopi	= 480 gram
Massa Ekstrak Biji Kopi Robusta	= 14,6162 gram

Perhitungan tersebut kemudian digunakan sebagai acuan, apabila menyesuaikan kebutuhan 3 *cups* kopi setara dengan 24,75 gram biji kopi robusta maka didapatkan massa ekstrak biji kopi robusta sebanyak 0,72 gram. Berdasarkan penghitungan massa ekstrak biji kopi robusta Lampung tersebut, didapatkan konsentrasi ekstrak biji kopi robusta Lampung adalah sebagai berikut.

$$C1 = \frac{m1}{m2} \times C2$$

Keterangan:

C1 = Konsentrasi sampel baru

C2 = Konsentrasi sampel yang telah diketahui

m1 = Massa sampel baru

m2 = Massa sampel yang telah diketahui

$$C1 = \frac{0,72}{24,75} \times 0,05$$

$$C1 = 0,0015 \text{ g/ml}$$

Dkonsentrasi 0,0015 g/ml didapatkan dosis terapeutik 8,1 ml/200gBB/hari. Namun, berdasarkan kapasitas lambung tikus yang hanya 3-5 ml maka pemberian dengan volume tersebut terlalu besar untuk diberikan. Oleh karena itu, dilakukan pemekatan konsentrasi sebesar 8x dari konsentrasi awal agar

didapatkan volume pemberian ke tikus dengan jumlah yang lebih sedikit.

Konsentrasi ekstrak biji kopi robusta Lampung awal= 0,0015 g/ml

Konsentrasi dinaikkan 8x menjadi = 0,012 g/ml

Efek terapeutik yang sama akan didapatkan dengan membagi 8 dosis terapeutik awal.

Dosis terapeutik awal = 8,1 ml/200gBB/hari

Dosis terapeutik baru = 1 ml/200gBB/hari

Berdasarkan penghitungan tersebut, dosis kopi yang diberikan kepada tikus putih jantan adalah 1 ml/200gBB/hari yang dianggap sebagai dosis terapeutik (P2) kemudian dosis dibagi dua menjadi 0,5 ml/200gBB/hari sebagai dosis rendah (P1) dan dikalikan dua menjadi 2 ml/200gBB/hari sebagai dosis tinggi (P3). Namun, untuk menyetarakan agar pemberian jumlah paparan yang diterima oleh setiap kelompok adalah sama maka diperlukan penyesuaian dosis kopi yang diberikan kepada tikus putih jantan yaitu sebesar 1 ml/200gBB/hari untuk setiap kelompok perlakuan P1, P2, dan P3. Pada kelompok perlakuan P1, untuk mendapatkan dosis kopi 1 ml/200gBB/hari maka diperlukan penyesuaian terhadap konsentrasi ekstrak biji kopi robusta Lampung yaitu sebagai berikut.

$$C1 = \frac{V1}{V2} \times C2$$

Keterangan:

C1 = Konsentrasi sampel baru

C2 = Konsentrasi sampel yang telah diketahui

V1 = Volume sampel baru

V2 = Volume sampel yang telah diketahui

$$C1 = \frac{0,5}{1} \times 0,012$$

$$C1 = 0,006 \text{ g/ml}$$

Pada kelompok perlakuan P3, untuk mendapatkan dosis kopi 1 ml/200gBB/hari maka diperlukan penyesuaian terhadap konsentrasi ekstrak biji kopi robusta Lampung yaitu sebagai berikut.

$$C1 = \frac{2}{1} \times 0,012$$

$$C1 = 0,024 \text{ g/ml}$$

Jadi, dosis kopi yang diberikan kepada tikus putih jantan adalah 1 ml/200gBB/hari pada setiap kelompok perlakuan P1, P2, dan P3 dengan konsentrasi ekstrak biji kopi robusta Lampung pada kelompok perlakuan P1, P2, dan P3 secara berurutan adalah 0,006 g/ml, 0,012 g/ml, dan 0,024 g/ml.

3.6.9.3 Pembuatan Larutan Ekstrak Biji Kopi Robusta Lampung

Pada kelompok perlakuan P1, pembuatan larutan ekstrak biji kopi robusta Lampung dengan konsentrasi 0,006 g/ml didapatkan dengan cara melarutkan 0,006 gram ekstrak biji kopi robusta Lampung pekat 100% kemudian dilarutkan ke dalam 1 ml aquades atau juga dapat dilakukan dengan cara melarutkan 0,3 gram ekstrak biji kopi robusta Lampung pekat 100% kemudian dilarutkan ke dalam 50 ml aquades.

Pada kelompok perlakuan P2, pembuatan larutan ekstrak biji kopi robusta Lampung dengan konsentrasi 0,012 g/ml didapatkan dengan cara melarutkan 0,012 gram ekstrak biji kopi robusta Lampung pekat 100% kemudian dilarutkan ke dalam 1 ml aquades atau juga dapat dilakukan dengan cara melarutkan 0,6 gram ekstrak biji kopi robusta Lampung pekat 100% kemudian dilarutkan ke dalam 50 ml aquades.

Pada kelompok perlakuan P3, pembuatan larutan ekstrak biji kopi robusta Lampung dengan konsentrasi 0,024 g/ml didapatkan dengan cara melarutkan 0,024 gram ekstrak biji kopi robusta Lampung pekat 100% kemudian dilarutkan ke dalam 1 ml aquades atau juga dapat dilakukan dengan cara melarutkan 1,2 gram ekstrak biji kopi robusta Lampung pekat 100% kemudian dilarutkan ke dalam 50 ml aquades. Larutan tersebut diberikan secara peroral kepada tikus putih jantan dengan dosis kopi adalah 1 ml/200gBB/hari pada setiap kelompok perlakuan P1, P2, dan P3 dengan konsentrasi ekstrak biji kopi robusta Lampung pada kelompok perlakuan P1, P2, dan P3 secara berurutan adalah 0,006 g/ml, 0,012 g/ml, dan 0,024 g/ml.

3.6.10 Pemberian Perlakuan

Tikus putih diinduksi dengan MSG dan ekstrak biji kopi robusta Lampung selama 14 hari setelah melewati masa adaptasi. Setiap kelompok diberikan perlakuan yang berbeda yaitu sebagai berikut.

1. Kelompok Kontrol Negatif (K-)

Kelompok tikus putih jantan yang diberi aquades dengan volume 3 ml dengan frekuensi satu kali sehari selama 14 hari secara peroral.

2. Kelompok Kontrol Positif (K+)

Kelompok tikus putih jantan yang diinduksi oleh MSG 4 g/kgBB dalam 3 ml aquades dengan frekuensi satu kali sehari selama 14 hari secara peroral.

3. Kelompok Perlakuan 1 (P1)

Kelompok tikus putih jantan yang diinduksi oleh MSG 4 g/kgBB dalam 2 ml aquades dan ekstrak biji kopi robusta (*Coffea canephora*) Lampung 1 ml/200gBB/hari konsentrasi 0,006 g/ml dengan frekuensi satu kali sehari selama 14 hari secara peroral.

4. Kelompok Perlakuan 2 (P2)

Kelompok tikus putih jantan yang diinduksi oleh MSG 4 g/kgBB dalam 2 ml aquades dan ekstrak biji kopi robusta (*Coffea canephora*) Lampung 1 ml/200gBB/hari konsentrasi 0,012 g/ml dengan frekuensi satu kali sehari selama 14 hari secara peroral.

5. Kelompok Perlakuan 3 (P3)

Kelompok tikus putih jantan yang diinduksi oleh MSG 4 g/kgBB dalam 2 ml aquades dan ekstrak biji kopi robusta (*Coffea canephora*) Lampung 1 ml/200gBB/hari konsentrasi 0,024 g/ml dengan frekuensi satu kali sehari selama 14 hari secara peroral.

Pemberian ekstrak biji kopi robusta lampung dan larutan MSG diberikan secara peroral dengan menggunakan sonde oral dengan menempelkan sonde oral di langit-langit mulut mencit, lalu dimasukkan perlahan hingga ke esophagus kemudian memasukkan ekstrak biji kopi robusta lampung dan larutan MSG sesuai dengan dosis yang telah ditentukan ke dalam lambung hewan coba. Pastikan terlebih dahulu posisi kepala hewan coba dalam posisi menengadah dan membuka sedikit mulutnya agar sonde oral tepat masuk ke dalam lambung hewan coba. Jika terdapat kekeliruan maka larutan yang diberikan dapat masuk ke dalam paru-paru yang berakibat pada terganggunya sistem pernafasan hingga berujung kematian (Putri, 2018).

Ekstrak biji kopi robusta lampung diberikan dalam 3 kelompok perlakuan dengan 1 dosis sama dan 3 konsentrasi berbeda setelah terpapar MSG 4 g/kgBB/hari. Hal ini ditujukan untuk melihat adanya efek protektif pada testis dari bahan antioksidan yang terkandung di dalam ekstrak biji kopi robusta lampung yang ditandai dengan adanya peningkatan jumlah, motilitas, dan morfologi spermatozoa.

3.6.11 Pengambilan Bagian Testis

Pengambilan bagian testis dilakukan setelah 14 hari diberi perlakuan, selanjutnya dilakukan prosedur anestesi dengan diberikan ketamine dengan dosis 0,2 ml/100gBB secara injeksi intraperitoneal pada setiap hewan coba. Selanjutnya dilakukan prosedur pembedahan bagian testis. Bagian testis diambil dengan menggunakan pinset. Lalu testis tikus diletakkan pada gelas ukur berisi NaCl 0,9 % agar dapat memisahkan testis dan lemak dengan mudah.

3.6.12 Pengambilan dan Pengamatan Spermatozoa

Tahap selanjutnya setelah dilakukan proses pengambilan bagian testis adalah dilakukan prosedur sebagai berikut:

a. Pengambilan Sekresi Kauda Epididimis

Kauda epididymis diletakkan di bawah mikroskop bedah kemudian dipisahkan dengan cara memotong bagian proksimal korpus epididimis dan bagian distal vas deferens. Selanjutnya kauda epididimis dimasukkan ke dalam gelas arloji yang berisi 1 mL NaCl 0,9%, kemudian bagian proksimal kauda dipotong sedikit dengan gunting dan tekan perlahan hingga cairan sekresi epididimis keluar dan tersuspensi NaCl 0,9%. Suspensi spermatozoa dari kauda epididimis yang diperoleh dapat digunakan untuk pengamatan yang meliputi Jumlah, morfologi, dan motilitas spermatozoa.

b. Penghitungan Jumlah Spermatozoa

Suspensi spermatozoa yang telah diperoleh terlebih dahulu dihomogenkan dengan mikropipet. Menghitung jumlah spermatozoa dapat dilakukan pengenceran dengan NaCl 0,9%. Selanjutnya diambil sebanyak 10 µl sampel dan dimasukkan ke dalam kotak-kotak *hemocytometer improved Neubauer* serta ditutup dengan kaca penutup. Di bawah mikroskop cahaya dengan perbesaran 100x, hemocytometer diletakkan dan dihitung

jumlah spermatozoa pada kotak kamar hitung. Hasil perhitungan jumlah spermatozoa kemudian dimasukkan ke dalam rumus penentuan jumlah spermatozoa ml suspensi sekresi kauda epididimis sebagai berikut (Alrizaldi, *et al.*, 2021).

$$\text{Jumlah spermatozoa} = \frac{n}{\text{pengenceran}} \times 10^6 \text{ juta/ml}$$

c. Motilitas Spermatozoa

Untuk menentukan motilitas spermatozoa diambil spermatozoa dari kauda epididimis seperti penjelasan di atas kurang lebih 0,5 ml ke atas gelas objek lalu ditetesi dengan NaCl 0,9%. Kemudian diaduk hingga homogen. Setelah itu, amati motilitasnya pada pembesaran mikroskop 400x. Perhitungan motilitas spermatozoa dilakukan dengan menghitung persentase spermatozoa di bawah mikroskop cahaya dengan pembesaran 400 kali, dihitung yang pergerakannya progresif maju ke depan dibandingkan dengan seluruh teramati (bergerak dan tidak bergerak) kemudian dikali dengan 100% (Mulyono *et al.*, 2021).

$$\% \text{motilitas} = \frac{\text{jumlah spermatozoa yang bergerak } (n)}{\text{jumlah spermatozoa total yang diamati } (N)} \times 100\%$$

Adapun kriteria motilitas menurut WHO tahun 2010 sebagai berikut:

1. Motilitas progresif: Spermatozoa bergerak secara aktif, secara linear atau lingkaran yang besar.
2. Motilitas yang tidak progresif: Spermatozoa bergerak dalam lingkaran yang kecil, hanya menggerakkan bagian kepala spermatozoa, atau ekornya saja.
3. Immotilitas: tidak bergerak

d. Morfologi Spermatozoa

Untuk memeriksa morfologi spermatozoa, spermatozoa yang didapat dari kauda epididimis dibuat apusan dengan kaca objek, kemudian dikeringkan. Setelah itu difiksasi dengan metanol selama 5 menit, selanjutnya diwarnai dengan larutan giemsa selama 15 menit dan dibilas dengan air mengalir. Sediaan preparat kemudian dikeringkan pada suhu ruang. Penghitungan dilakukan di bawah mikroskop dengan perbesaran 400 kali (Mulyono et al., 2021)

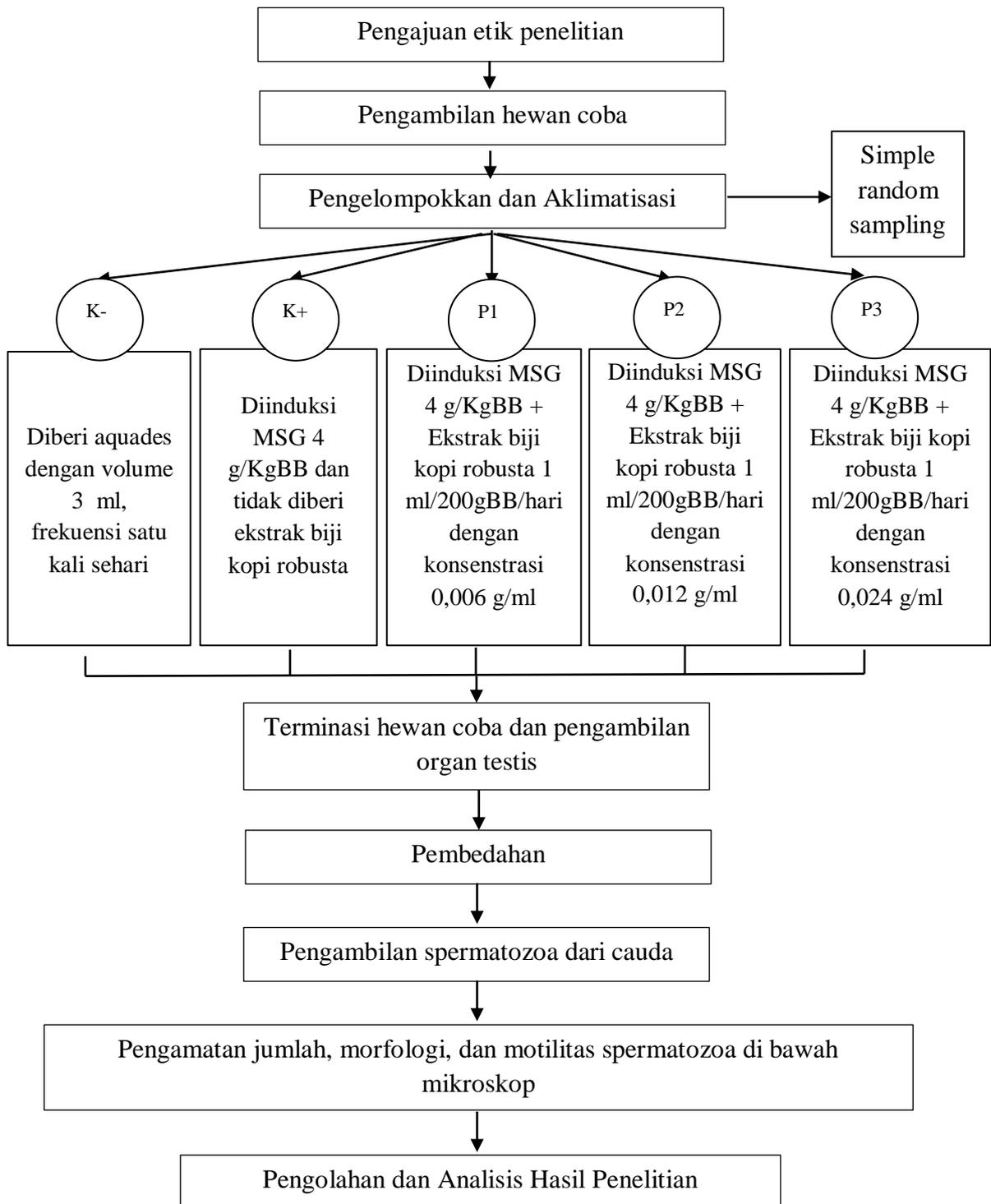
Ciri morfologi spermatozoa normal yaitu bentuk kepala seperti kait pancing dan ekor panjang lurus. Sebaliknya, morfologi spermatozoa abnormal memiliki bentuk kepala tidak beraturan, berbentuk seperti pisang, atau terlalu bengkok dan ekor tidak lurus bahkan tidak berekor, atau hanya terdapat ekor tanpa kepala. Morfologi spermatozoa abnormal dapat diketahui dengan menghitung 100 spermatozoa. Untuk penentuan persentase morfologi spermatozoa digunakan rumus sebagai berikut:

$$\% \text{morfologi} = \frac{\text{jumlah morfologi normal}}{\text{jumlah morfologi normal} + \text{abnormal}} \times 100\%$$

3.7 Pengolahan dan Analisis Data

Kelompok penelitian ini terdiri dari lima kelompok yaitu dua kelompok kontrol dan tiga kelompok perlakuan. Pada tiap kelompok, data yang terkumpul dianalisis dengan program pengolah data statistik untuk menilai apakah data berdistribusi normal atau tidak secara statistik. Uji normalitas data menggunakan uji *Saphiro-Wilk* karena sampel yang digunakan kurang dari sama dengan 50. Jika nilai $p > 0,05$ maka data dikatakan terdistribusi normal. Selanjutnya untuk menentukan data yang homogen atau tidak maka dilakukan uji varians (*Levene's Test*). Varians data yang diuji dikatakan homogen apabila didapatkan hasil nilai $p > 0,05$. Jika distribusi data normal dan homogen, maka dapat dilanjutkan dengan uji parametrik *One Way ANOVA*. Hipotesis dikatakan diterima apabila nilai $p < 0,05$. Untuk menilai kebermaknaan antar kelompok dilanjutkan dengan analisis *Post Hoc LSD*.

3.8 Alur Penelitian



Gambar 13. Alur Penelitian

3.10 Etika Penelitian

Penelitian ini sudah mendapatkan persetujuan etik dari Komite Etik Penelitian Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Lampung dengan nomor surat 443/UN26.18/PP.05.02.00/2022.

BAB V

SIMPULAN DAN SARAN

5.1. Simpulan

Terdapat pengaruh pemberian ekstrak biji kopi robusta (*Coffea canephora*) Lampung terhadap jumlah, motilitas, dan morfologi spermatozoa tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan galur Sparague-dawley yang diinduksi monosodium glutamate. Namun, peningkatan dosis berbanding terbalik terhadap peningkatan efek repro-protektif yang diberikan.

5.2. Saran

Adapun saran pada penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Kepada peneliti lain untuk lebih memerhatikan kondisi lingkungan berupa tempat adaptasi dan perlakuan hewan coba.
2. Kepada peneliti lain untuk melakukan penelitian lebih lanjut tentang penggunaan zat aktif kopi yang bersifat repro-protektif.

DAFTAR PUSTAKA

- Abduh MY. 2018. Dari ITB untuk indonesia biorefinery kopi. Bandung. ITB Press.
- Akbar A. 2020. Gambaran Faktor Penyebab Infertilitas Pria Di Indonesia: Meta Analisis. J. Pandu Husada. Vol. 1(2): 66.
- Akbar B. 2010. Tumbuhan dengan kandungan senyawa aktif yang berpotensi sebagai bahan antifertilitas. Jakarta: Adabia Press
- Aklimawati L, Yusianto, Surip M. 2014. Karakteristik mutu dan agribisnis kopi robusta di lereng gunung tambura, sumbawa. J. Pelita Perkebunan. Vol. 30(2); 159-180.
- Alrizaldi A, Aisyah R, and Jatmiko S. 2021. The Effect of Coffee on The Quantity of Spermatozoa of Diabetic Wistar Rats Inducted By Aloxan. Herb-Medicine Journal. Vol. 4(2): 11.
- Andini, S., 2015. Infertility. Majority. Vol. 4(5): 5-9.
- Anzila I, Marhendra A, Rahayu S. 2019. The Effect of Monosodium L-Glutamate (MSG) Treatment for Short and Long Terms to The Semen Quality of Adult Male Rats. The Journal of Experimental Life Sciences. Vol. 9(2): 116-121.
- Aprioku J, Boms R, Ife-tubiyele D. 2020. Effect of simultaneous coffee/caffeine and ethanol administration on sperm quality and reproductive hormones: an experimental study in Sprague Dawley rats. Drug and Chemical Toxicology. Vol. 45(3): 1012-20.
- Badan Pusat Statistik (2012). Sensus penduduk indonesia 2012.
- Badan Pusat Statistik. 2020. Statistik Kopi Indonesia 2019. Badan Pusat Statistik/BPS Indonesia.
- Bilondatu RSS, Meilany D, Poppy L. 2016. Gambaran histopatologik testis tikus wistar (*Rattus norvegicus*) setelah pemberian monosodium glutamate (MSG). J. e-Biomedik (eBM). Vol. 4 (2):__

- Cynober L. 2018. Metabolism of dietary glutamate in adults. *Ann Nutr Metab.* Vol. 73(5): 5-14.
- Damayanti J, Sukasri A, Nurdin M. 2020. The caffeination of robusta coffee beans through extraction process with distilled water. *Indonesian Journal of Chemical Technology.* Vol.1(1): 39-40.
- Dias R. C. E dan M. de T. Benassi. 2015. Discrimination between Arabica and Robusta Coffees Using Hydrosoluble Compounds: Is the Efficiency of the Parameters Dependent on the Roast Degree. *Beverages.* Vol. 1:127-139.
- Direktorat Jenderal Perkebunan. Statistik perkebunan Indonesia komoditas kopi 2016-2018. 2017; Direktorat Jenderal Perkebunan.
- Dong H, Robbins W. 2015. Ingestion of monosodium glutamate (MSG) in adult male rats reduces sperm count, testosterone, and disrupts testicular histology. *Nutrition Bytes.* Vol. 19(1):6.
- Dja'afara AL, Benny W, Lydia T. 2015. Pengaruh pemberian kopi terhadap kualitas spermatozoa tikus wistar jantan (*Rattus norvegicus*) yang diberi paparan asap rokok. *J. e-Biomedik (eBM).* Vol. 3(2): 676-80.
- Edward Z., 2015. Pengaruh pemberian monosodium glutamat (MSG) pada tikus jantan (*Rattus Norvegicus*) terhadap fsh dan lh. *Majalah Kedokteran Andalas.* Vol. 34(2): 160.
- Erris, Irma Harahap. 2014. Pengaruh Kebisingan terhadap kuantitas dan kualitas spermatozoa tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan dewasa. *Media litbangkes.* Vol. 24 (3): 123-8
- Eroschenko VP. 2015. Atlas hisitologi difiore: dengan korelasi fungsional, Ed. 12. Jakarta: EGC.
- El-Khadragy M., AL-Megrin W, Alomar S, Alkhuriji A, Metwally D, Mahgoub S, Amin H, Habotta O, Abdel Moneim A, Albeltagy R. 2021. Chlorogenic acid abates male reproductive dysfunction in arsenic-exposed mice via attenuation of testicular oxido-inflammatory stress and apoptotic responses. *Chemico-Biological Interactions.* Vol. 109-333.
- Farhaty N, Muchatridi. 2016. Tinjauan kimia dan aspek farmakologi senyawa asam klorogenat pada biji kopi: review. *Farmaka,* Vol. 14(1):-.
- Farombi E.O, O.O. Onyena. 2006. Monosodium glutamate-induced oxidative damage and genotoxicity in the Rat: modulatory role of vitamin c, vitamin E and quercetin. *J. Hum. Exp. Toxicol.* Vol. 25: 251-9.
- Food and Drug Administration. (2018). Spilling the Beans: How Much Caffeine is Too Much?. United states

- Fitriana VN, Safari WJ., 2020. Pengaruh pemberian kopi terhadap morfologi spermatozoa tikus wistar (*Rattus norvegicus*) diabetik yang diinduksi aloksan. *J Thalamus*. Vol.-.: 462-71
- Fitria L, Mulyati, Cut MT, Andreas SB. 2015. Profil reproduksi jantan tikus (*Rattus norvegicus*) galur wistar stadia muda, pradewasa, dan dewasa. *J. Biologi Papua*. Vol. 7 (1): 29-36.
- Frianto F, Fajriaty I, Riza, H., 2015. Evaluasi faktor yang mempengaruhi jumlah perkawinan tikus putih (*Rattus norvegicus*) secara kualitatif. *J. Mahasiswa Farmasi Fakultas Kedokteran Untan*. Vol. 3(1):-.
- Guyton A. C., Hall, J. E., 2014. Buku ajar fisiologi kedokteran. Edisi 12. Jakarta : EGC, 1022
- Hanipah E.N.A., Yahya N.J., Ajik E.M., Yusoff N.A., Taib I.S. 2018 Monosodium glutamate induced oxidative stress in accessory reproductive organs of male sprague-dawley rats. *J. Sains Kesihat Malays*. Vol. 1(6): 67-73.
- Haris RA, Lydia T, Grace T. 2016. Pengaruh pemberian kopi terhadap kualitas spermatozoa tikus wistar (*Rattus norvegicus*) yang terpapar stress. *J. e-Biomedik (eBM)*. Vol. 4(2): -
- Hartono KM, Mahayu DA, Dhega AW. 2016. Pengaruh pemberian kopi terhadap motilitas spermatozoa tikus wistar yang dipapar sinar ultraviolet. *J. Kedokteran Diponegoro*. Vol. 5(4): 1161-70.
- Hatta, Moch. 2016 Penentuan abnormalitas pergerakan spermatozoa manusia berbasis regresi linier. Masters thesis, Institut Teknologi Sepuluh Nopember.
- Herawati D, Giriwono PE, Dewi FNA, Kashiwagi T, Andarwulan N. 2019. Critical roasting level determines bioactive content and antioxidant activity of Robusta coffee beans. *Food Sci Biotechnol*. Vol. 28(1):7-14.
- Herawati H.dan Sukohar A. 2013. Pengaruh asam klorogenat kopi robusta lampung terhadap ekspresi cyclin d1 dan caspase 3 pada cell lines hep-g2. seminar nasional sains dan teknologi V. Lampung: Fakultas Kedokteran Universitas Lampung.
- Huda N, Halim A, Auni N, Abidin Z & Me R, 2013. A study of chemical compounds in *Rhizophora apiculata*. *Bentham Open*, Vol. 4(Mei): 108-10.
- Ilham Nugroho. 2020. Pengaruh pemberian ekstrak biji kopi robusta (*Coffea canephora*) lampung terhadap jumlah sel purkinje cerebellum tikus putih

(*Rattus norvegicus*) jantan galur sprague-dawley yang diinduksi monosodium glutamat. Skripsi: Universitas Lampung

- Janvier Labs. 2013. Research model: sprague dawley rat [Online]. Tersedia di: <http://www.janvier-labs.com/rodent-research-models-services/research-models/per-species/outbred-rats/product/sprague-dawley.html> [Diakses: 4 Desember 2020].
- Jenagrad PA, Kia HD, Moghaddam G. Ebrahimi M. 2018. Evaluating Caffeine Antioxidant Properties on Ghezel Ram Sperm Quality after Freeze Thawing. *Reveu Med Vet.* Vol. 169(10-12):233-240.
- Jubaidi F, Mathialagan R, Noor M, Taib I, Budin S. 2019. Monosodium glutamate daily oral supplementation: study of its effects on male reproductive system on rat model. *Systems Biology in Reproductive Medicine.* Vol. 65(3): 194-204.
- Kaushalya W, Jagath W. 2017. Uses, effects and properties of monosodium glutamate (MSG) on food & nutrition. *Int J Food & Sci.* Vol. 2(3): 132-43.
- Kazmi Z, Fatima I, Perveen S, Malik SS. 2017. Monosodium glutamate: review on clinical reports. Vol. 20(52): 1807-15.
- Kumar K, P. Raju A. B. 2011. A review on male fertility. *Hygeia J.D. Med.* Vol. 3 (1): 20-8
- Mescher, A.L. 2016. Junqueira's basic histology:text and atlas. 14th edition. USA: McGraw-Hill Education.
- Metro, D., Cernaro, V., Santoro, D., Papa, M., Buemi, M., Benvenga, S. and Manasseri, L., 2017. Beneficial effects of oral pure caffeine on oxidative stress. *J. Clinical & Translational Endocrinology.* Vol. 10: 22-7.
- Mulyono, Y., Prihasna, S., Wibowo, D., Johan, A., Ngestiningsih, D. and Juniarto, A., 2021. The Effect of Coffee on Spermatozoa Motility and Morphology of BALB/c Mice Exposed to Electric Mosquito Repellent. *Sains Medika.* Vol. 12(1):_
- Muntaza Y, Adi A. 2020. Hubungan sumber informasi dan pengalaman dengan tingkat pengetahuan tentang penggunaan monosodium glutamate (MSG) pada ibu rumah tangga. *Amerta Nutrition.* Vol. 4(1):72.
- Namula Z, Hirata M, Wittayarat M, Tanihara F, Thinguyen N, Hirano T, Nii M, Otoi T. 2018. Effects of chlorogenic acid and caffeic acid on the quality of frozen –thawed boar sperm. *J. Reprod Domestic Anim.* Vol. 53(6): 1600-4.

- Naveed M, Hejazi V, Abbas M, Kamboh A, Khan G, Shumzaid M, Ahmad F, Babazadeh D, FangFang X, Modarresi-Ghazani F, WenHua L, XiaoHui Z. 2018. Chlorogenic acid (CGA): A pharmacological review and call for further research. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. Vol. 97:67-74.
- Pebrianti, N. 2013. Kualitas spermatozoa mencit jantan dewasa (*Mus musculus* L.) setelah diberi monosodium glutamat (MSG). *Simbiosis I*. Vol. 1(1): 40-50.
- Purwanto, Duando R, Bambang RW. 2020. Karakter agronomis dan fisiologis tanaman kopi robusta (*Coffea canephora*) pada dataran tinggi di kecamatan Pejawaran Kab. Banjarnegara. *Composite: J. ilmu pertanian*. Vol. 2 (1): 11-6.
- Pangabean E. 2011. Buku pintar kopi. Jakarta Selatan: PT Agro Media Pustaka.
- Prastowo B, Karmawati E, Rubijo, Siswanto, Indrawanto, C. Munarso, S.J. 2010. Budidaya dan pasca panen kopi. Bogor: Pusat penelitian dan pengembangan perkebunan.
- Prijatni, I. and Rahayu, S., 2016. Kesehatan reproduksi dan keluarga berencana. 1st ed. Jakarta: Kementerian Kesehatan Republik Indonesia.
- Rahmadiani, D., 2021. Ekstrak pollen kurma (*Phoenix dactylifera* L) sebagai terapi infertilitas pada pria. *Jurnal Ilmiah Kesehatan Sandi Husada*, Vol. 10(1): 31-40.
- Rahmawati MA, Fibrianto K. 2018. Karakterisasi sensori kopi robusta dampit: kajian pustaka. *J. Pangan dan Agroindustri*. Vol. 6(1): 75-9.
- Rahimi Anbarkeh, F., Baradaran, R., Ghandy, N., Jalali, M., Reza Nikraves, M. and Soukhtanloo, M., 2019. Effects of monosodium glutamate on apoptosis of germ cells in testicular tissue of adult rat: An experimental study. *International J. Reproductive BioMedicine*, Vol. 17(4):261-70.
- Ricci e, Paola v, Sonia C, Edgardo s, Francesca C, Alessandro b, Fabio p. 2015. Coffee and caffeine intake and male infertility: a systematic review. *nutrition journal*. Vol. 16(37): 1-14.
- Riset Kesehatan Dasar (Riskesdas). 2013. Badan penelitian dan pengembangan. Kesehatan Kementerian RI tahun 2013.
- Rukmana, HR. 2014. Untung selangit dari agribisnis kopi. Yogyakarta: Lily Publisher.

- Rusli, Sakiroh, Wardiana E. 2015. Pengaruh pemupukan terhadap pertumbuhan, hasil dan kualitas biji empat klon kopi robusta di tanah podsolik merah kuning, Lampung Utara. *J TIDP*. Vol. 2(2):107-12.
- Saputra A, Sitasiwi A, Saraswati T. 2020. Gonadosomatic index tikus jantan (*Rattus norvegicus*) setelah paparan ekstrak daun mimba (*Azadirachta indica*) sebagai senyawa antiinfertilitas. *J. Pro-Life*. Vol. 7(3).
- SCAA. 2015. SCAA standard golden cup. USA: Specialty Coffee Association of America.
- Sherwood L. 2015. Fisiologi manusia dari sel ke sistem. Edisi ke-6. Jakarta: EGC.
- Siregar, H. J. 2009. Pengaruh pemberian vitamin c terhadap jumlah sel leydig dan jumlah sperma mencit jantan dewasa yang dipapari MSG. M. Biomed Tesis. Medan: Universitas Sumatera Utara.
- Sukohar A, Setiawan, Firman FW, Herry SS. 2011. Isolation and characterization cytotoxic compounds caffeine and chlorogenic acid seeds of lampung coffee robusta. *J. Medika Planta*. Vol. 1(4): 11-26.
- Sulastri, S. 2017. Analisis kadar monosodium glutamat (MSG) pada bumbu mie instan yang diperjualbelikan di koperasi wisata universitas indonesia timur. *J. Media Laboran*. Vol. 7(1): 5-9.
- Susetyarini R. 2015. Jumlah sel spermiogenesis tikus putih yang diberi tanin daun beluntas (*Pluchea indica*) sebagai sumber belajar. *Proceeding Biology Education Conference*. Vol. 12(1):_
- Susilawati D, Vanessa R. 2019. Hubungan obesitas dan siklus menstruasi dengan kejadian infertilitas pada pasangan usia subur di klinik dr. Hj. Putri sri lasmini SpOG (K) periode januari-juli tahun 2017. *J. Kesehatan Mercusuar*. Vol. 2(1): 8.
- Syahputra T, Ichwan M, Sufitni. 2019. Efek jus semangka terhadap jumlah Dan motilitas spermatozoa tikus wistar yang dipapari MSG. *Health care: J. Kesehatan*. Vol. 8(2): 43-50.
- Taxonomic Information System (ITIS). 2021. *Coffea canephora* Pierre ex A. Froehner
- Tortora GJ, Derrickson B. 2014. Principles of anatomy & physiology. 13th Edition. United States of America: John Wiley & Sons, Inc. 1043-1046.
- 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. *Food Res*. Vol. 61(1):279-85.

- World Health Organization. 2020. Infertility. [online] Available at: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/infertility>> [Accessed 5 September 2021].
- Wolfensohn S, Lloyd M. 2013. Handbook of laboratory animal management and welfare, 4th ed., Wiley-Blackwell, West Sussex, 234.
- Wuwungan, C., de Queljoe, E. and Wewengkang, D., 2017. Kualitas spermatozoa tikus putih jantan galur wistar (*Rattus norvegicus*L.) setelah pemberian ekstrak etanol daun sirih (*Piper Betle*L.). *Pharmacon*. Vol. 6(3):_
- Yaqin MA, Nurmilawati M. 2015. Pengaruh ekstrak kopi robusta (*Coffea robusta*) sebagai penghambat pertumbuhan *staphylococcus aureus*. Kediri: Universitas Nusantara PGRI Kediri Press.