



**EFEK PEMBERIAN SEDUHAN KOPI ROBUSTA (*Coffea canephora*) TERHADAP PEMBENTUKAN LESI
ATEROSKLEROSIS KAROTIS PADA
TIKUS WISTAR (*Rattus norvegicus*)
HIPERLIPIDEMIA**

SKRIPSI

Oleh
Fadinda Aisa Wiranadiany
NIM 141610101045

**FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI
UNIVERSITAS JEMBER
2018**



**EFEK PEMBERIAN SEDUHAN KOPI ROBUSTA (*Coffea
canephora*) TERHADAP PEMBENTUKAN LESI
ATEROSKLEROSIS KAROTIS PADA
TIKUS WISTAR (*Rattus norvegicus*)
HIPERLIPIDEMIA**

SKRIPSI

**diajukan guna melengkapi tugas akhir dan memenuhi salah satu syarat
untuk menyelesaikan Program Studi Kedokteran Gigi (S1)
dan mencapai gelar Sarjana Kedokteran Gigi**

Oleh

Fadinda Aisa Wiranadiany

NIM 141610101045

**FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI
UNIVERSITAS JEMBER**

2018

PERSEMBAHAN

Skripsi ini saya persembahkan untuk :

1. Almamater saya Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember
2. Ibunda tercinta, Darmasiany; Ayahanda tercinta, Cholis Wirawan; kakak dan adik yang saya banggakan, Farinduany Wirastika dan Muhammad Fatahillah Aqsa Laksana Bahtera Nuh; dan keluarga besar saya.
3. Guru-guru TK, SD, SMP, SMA dan dosen-dosen di Perguruan Tinggi yang telah mengajarkan saya mengenai ilmu pengetahuan di dunia ini.

MOTTO

*And He is with you wherever you are. *)*

(Terjemahan Q.S Al-Hadid Ayat 4)



*) Departemen Agama Republik Indonesia. 2005. *Al Qur'an dan Terjemahannya Special of Women*. Jakarta: Yayasan Penerjemah/Penafsir Al-Qur'an.

PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan dibawah ini :

Nama : Fadinda Aisa Wiranadiany

NIM : 141610101045

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa skripsi yang berjudul “ Efek Pemberian Seduhan Kopi Robusta (*Coffea canephora*) terhadap Pembentukan Lesi Aterosklerosis Karotis pada Tikus Wistar (*Rattus Norvegicus*) Hiperlipidemia” adalah benar-benar hasil karya sendiri, kecuali kutipan yang sudah saya sebutkan sumbernya, belum pernah diajukan pada institusi manapun dan bukan karya jiplakan. Saya bertanggung jawab atas keabsahan dan kebenaran isinya sesuai dengan sikap ilmiah yang harus dijunjung tinggi.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya, tanpa adanya tekanan dan paksaan dari pihak manapun serta bersedia mendapat sanksi akademik jika ternyata di kemudian hari pernyataan ini tidak benar.

Jember, Maret 2018

Yang menyatakan,

Fadinda Aisa Wiranadiany

NIM 141610101045

SKRIPSI

**EFEK PEMBERIAN SEDUHAN KOPI ROBUSTA (*Coffea canephora*)
TERHADAP PEMBENTUKAN LESI ATEROSKLEROSIS
KAROTIS PADA TIKUS WISTAR (*Rattus norvegicus*)
HIPERLIPIDEMIA**

oleh

Fadinda Aisa Wiranadiany

NIM. 141610101045

Pembimbing

Dosen Pembimbing Utama : drg. Rendra Chriestedy P., M.DSc

Dosen Pembimbing Pendamping : drg. Nadie Fatimatuzzahro, M.DSc

PENGESAHAN

Skripsi berjudul “Efek Pemberian Seduhan Kopi Robusta (*Coffea canephora*) terhadap Pembentukan Lesi Aterosklerosis Karotis pada Tikus Wistar (*Rattus Norvegicus*) Hiperlipidemia” telah diuji dan disahkan oleh Fakultas Kedokteran Gigi pada:

hari, tanggal : 20 Maret 2018

tempat : Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember

Tim Penguji

Dosen Penguji Ketua

Dosen Penguji Anggota

drg. Nuzulul Hikmah, M.Biomed.

drg. Happy Harmono, M.Kes.

NIP. 198107172008012017

NIP. 196709011997021001

Pembimbing

Dosen Pembimbing Utama

Dosen Pembimbing Pendamping

drg. Rendra Chriestedy P., MD.Sc.

drg. Nadie Fatimatuzzahro, MD.Sc.

NIP. 198305312008011003

NIP. 198204242008012022

Mengesahkan,

Dekan Fakultas Kedokteran Gigi

Universitas Jember

drg. Rahardyan Parnaadji, M.Kes., Sp.Prost.

NIP. 196901121996011001

RINGKASAN

Efek Pemberian Seduhan Kopi Robusta (*Coffea canephora*) terhadap Pembentukan Lesi Aterosklerosis Karotis pada Tikus Wistar (*Rattus Norvegicus*) Hiperlipidemia. Fadinda Aisa Wiranadiany. 141610101045; 2018; 77 halaman; Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.

Aterosklerosis merupakan proses inflamasi yang bersifat progresif yang disebabkan oleh multifaktor, salah satunya yaitu kenaikan kadar *Low Density Lipoprotein* (LDL) yang merupakan ketidakseimbangan kadar lemak dalam darah atau dikenal dengan Hiperlipidemia. Kopi (*Coffea Sp.*) merupakan komoditas perkebunan yang paling akrab dengan masyarakat. Kopi robusta (*C. canephora*) memiliki kandungan kafein dan asam klorogenat dua kali lebih banyak daripada jenis kopi lainnya. Kandungan asam klorogenat dalam biji kopi robusta (*C. canephora*) memiliki efek sebagai antiinflamasi dan antioksidan, dan kafein memiliki efek sebagai antioksidan sehingga mampu melindungi tubuh dari efek radikal bebas.

Penelitian eksperimental laboratoris pada tikus wistar jantan (*Rattus norvegicus*) ini menggunakan rancangan *the post test only control group design*. Sampel penelitian adalah 12 ekor tikus wistar jantan, dengan kriteria tikus umur 3-4 bulan dan dalam keadaan sehat. Kelompok penelitian terdiri dari 3 kelompok (masing-masing terdiri dari 4 tikus), yaitu kelompok K (kelompok kontrol), kelompok H (kelompok hiperlipid), dan kelompok C (kelompok kopi).

Kelompok hiperlipid diberi pakan tinggi lemak berupa lemak babi yang telah dicairkan sebanyak 3gr/hari dan kuning telur bebek 2 ml/hari yang diberikan dua kali sehari diberikan dengan sonde lambung setiap pagi dan sore, sedangkan kelompok kopi diberi pakan tinggi lemak yang ditambah dengan seduhan kopi robusta sebanyak 3,6 ml/hari selama 28 hari. Pada hari ke-29 sebelum dilakukan dekapitasi, dilakukan pemeriksaan kadar *Low Density Lipoprotein* (LDL) pada serum darah hewan coba. Selanjutnya hewan coba dikorbankan untuk arteri karotis komunis bagian bifurkasi pada leher. Setelah difiksasi kemudian jaringan diproses dengan metode *frozen section* untuk membuat preparat histologi dengan

pengecatan *Picrosirius Red*, untuk pengamatan ketebalan dinding arteri karotis dan ateroma, serta pengecatan *Sudan IV* untuk pengamatan deposisi lipid.

Pengamatan dilakukan di bawah mikroskop cahaya dan optilab dengan pembesaran 100x dan 400x. Parameter aterosklerosis yang diamati adalah penebalan dinding arteri karotis, ateroma, dan deposisi lipid. Data morfometri ketebalan dinding arteri dilakukan analisis dengan uji *One Way ANOVA*, sedangkan morfologi ateroma dan deposisi lipid dinyatakan sebagai persentase terbentuknya lesi aterosklerosis.

Hasil penelitian menunjukkan dinding arteri karotis kelompok hiperlipid lebih tebal dibandingkan kelompok kontrol dan kelompok kopi secara signifikan ($p < 0,05$). Hasil pengamatan persentase ateroma dan deposisi lipid paling besar pada kelompok hiperlipid yaitu 75%. Hasil pemeriksaan kadar LDL pada hewan coba menunjukkan kelompok hiperlipid memiliki kadar LDL di atas batas normal.

Aterosklerosis merupakan suatu kelainan yang terdiri atas pembentukan fibrolipid lokal di dalam pembuluh sebagai hasil proses inflamasi dan oksidasi. Biji kopi robusta (*Coffea canephora*) mengandung senyawa aktif, yakni *caffeine*, asam klorogenat, flavonoid, dan *caffeic acid* yang memiliki efek sebagai antiinflamasi dan antioksidan. Hasil penelitian menunjukkan bahwa pemberian seduhan kopi robusta menghambat pembentukan lesi aterosklerosis karotis berupa ketebalan dinding arteri, ateroma, dan deposisi lipid pada tikus wistar hiperlipidemia.

PRAKATA

Puji syukur kehadiran Allah SWT atas segala rahmat, karunia dan hidayah-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Efek Pemberian Seduhan Kopi Robusta (*Coffea canephora*) terhadap Pembentukan Lesi Aterosklerosis Karotis pada Tikus Wistar (*Rattus norvegicus*) Hiperlipidemia”. Skripsi ini disusun untuk memenuhi salah satu syarat menyelesaikan pendidikan strata satu (S1) di Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.

Penyusunan skripsi ini dapat terselesaikan tidak lepas dari bantuan berbagai pihak. Oleh karena itu, penulis menyampaikan ucapan terimakasih kepada :

1. drg. Rendra Chriestedy Prasetya, MD.Sc., selaku Dosen Pembimbing Utama dan drg. Nadie Fatimatuzzahro, MD.Sc., selaku Dosen Pembimbing Pendamping yang telah memberikan ilmu, bimbingan, saran dan motivasi serta penuh kesabaran membimbing saya sehingga skripsi ini dapat terselesaikan dengan baik;
2. drg. Nuzulul Hikmah, M.Biomed., selaku Dosen Penguji Ketua dan drg. Happy Harmono, M.Kes, selaku Dosen Penguji Anggota yang telah banyak memberi masukan demi kesempurnaan skripsi ini;
3. drg. Rendra Chriestedy Prasetya, MD.Sc., selaku Dosen Pembimbing Akademik yang telah banyak memberikan nasihat, saran dan motivasi;
4. Ibunda tercinta Darmasiany dan Ayahanda tercinta Cholis Wirawan yang telah memberikan kasih sayang, nasihat, bimbingan, doa dan motivasi bagi saya sampai saat ini.
5. Kakak dan adik saya, Farinduan Wirastika dan Muhammad Fatahillah Aqsa Laksana Bahtera Nuh yang telah memberikan segala kasih sayang, canda tawa, dan doa bagi saya;
6. Seluruh keluarga besar saya yang selalu memberikan doa dan motivasi kepada saya.

7. Teman-teman tim penelitian “Peneliti Hiperlipid”: Yunita Fatma Citra Dewi, Kanwangwang Dwi Nada Anggara, dan Rudy Ramadhana yang selama ini telah bekerjasama dan saling memotivasi dalam menyelesaikan penelitian dan skripsi ini;
8. Sabahat-sahabat tercinta saya: Yunita Fatma Citra Dewi, Dea Lili Anis Nur Pratama, Aulia Maghfira Kusuma Wardhani, dan Septiana Putri Suciadi yang telah memberikan keceriaan, kasih sayang, doa, motivasi, dan menjadi tempat mencurahkan isi hati baik suka maupun duka;
9. Teman-teman Bulgis Queen Cottage tercinta: Faiz, Shinta, Dini, Rusella, Azza, Egi, Dea, Arie, Ade, dan Pipit yang senantiasa memberikan kasih sayang, doa, motivasi, dan dukungan selama ini;
10. Seluruh staf dan karyawan/karyawati Laboratorium Biomedik Fakultas kedokteran Gigi Universitas Jember;
11. Teman-teman seperjuangan saya di Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember angkatan 2014. Terimakasih atas persaudaraan, kebersamaan, dan motivasinya.

Penulis menyadari masih ada ketidaksempurnaan dalam penulisan skripsi ini sehingga kritik dan saran yang membangun sangat penulis harapkan demi kesempurnaan penulisan yang selanjutnya. Akhir kata, penulis berharap semoga skripsi ini bermanfaat.

Jember, Maret 2018

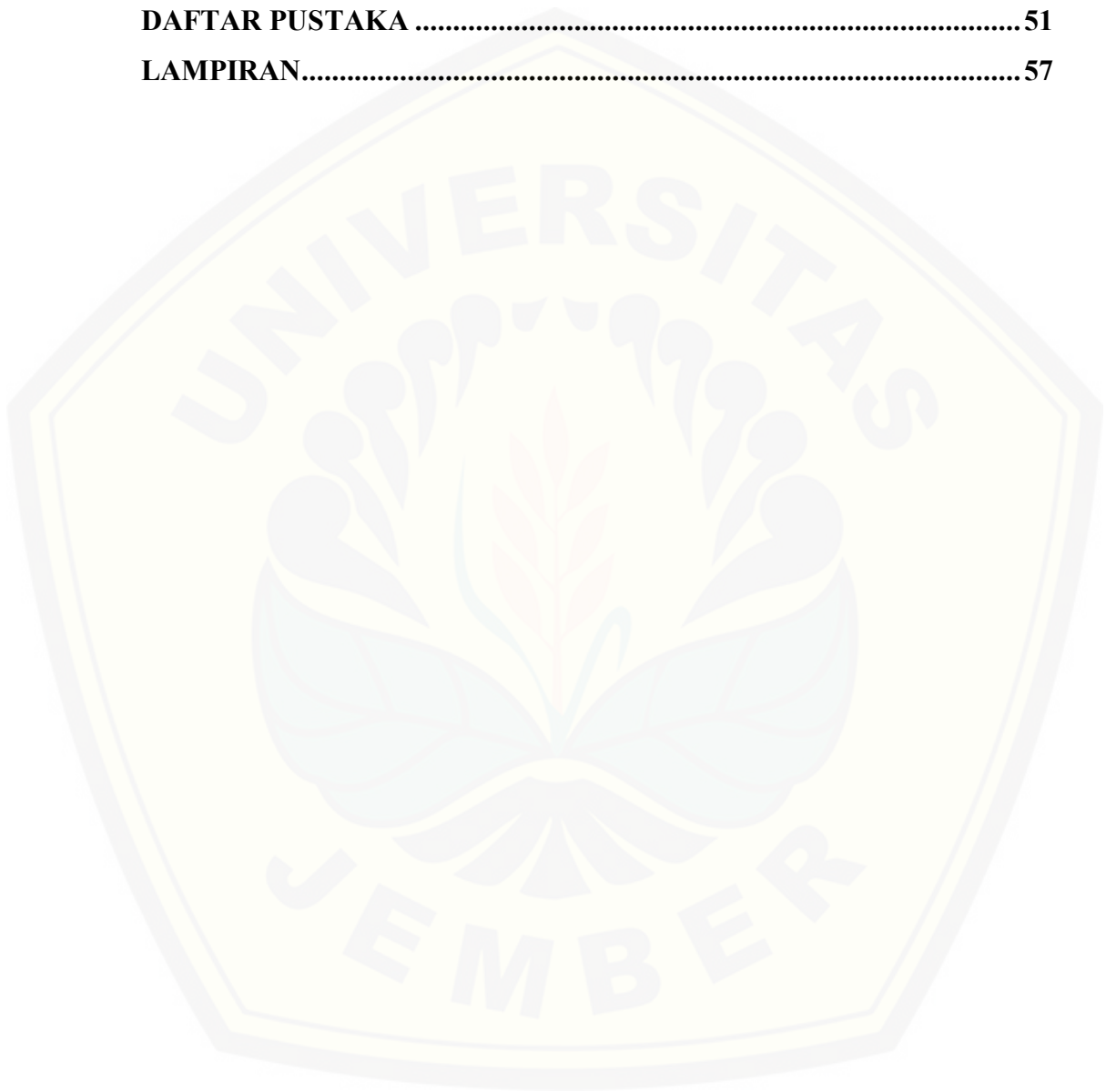
Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PERSEMBAHAN	ii
HALAMAN MOTTO	iii
HALAMAN PERNYATAAN.....	iv
HALAMAN PEMBIMBINGAN	v
HALAMAN PENGESAHAN	vi
RINGKASAN	vii
PRAKATA	ix
DAFTAR ISI	xi
DAFTAR TABEL	xiv
DAFTAR GAMBAR	xv
DAFTAR LAMPIRAN	xvi
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Tujuan Penelitian	3
1.4 Manfaat Penelitian	4
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	5
2.1 Arteri Karotis.....	5
2.2 Aterosklerosis.....	7
2.2.1 Definisi Aterosklerosis	7
2.2.2 Etiologi Aterosklerosis	7
2.2.3 Patogenesis Aterosklerosis	8
2.2.4 Tipe-tipe Lesi Aterosklerosis.....	11
2.3 Hiperlipidemia	13
2.3.1 Definisi Hiperlipidemia	13
2.4 Kopi Robusta (<i>Coffea canephora</i>)	16
2.4.1 Klasifikasi Tanaman Kopi Robusta	16

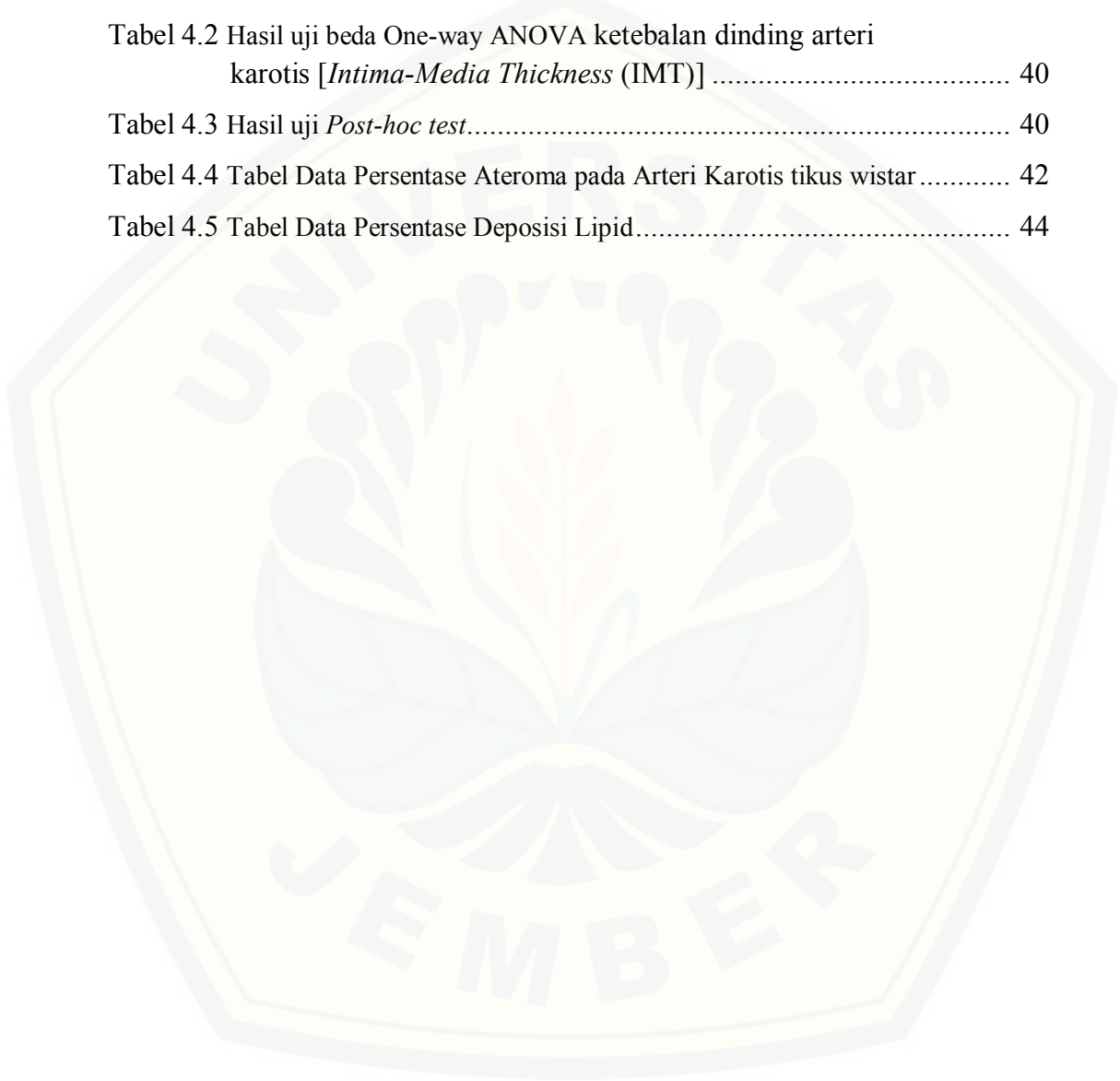
	Halaman
2.4.2 Habitat Tanaman Kopi Robusta.....	17
2.4.3 Struktur Biji Kopi Robusta.....	17
2.4.4 Kandungan Biji Kopi Robusta.....	19
2.5 Kerangka Teori.....	21
2.6 Hipotesis.....	22
BAB 3. METODE PENELITIAN.....	23
3.1 Jenis Penelitian.....	23
3.2 Rancangan Penelitian.....	23
3.3 Tempat dan Waktu Penelitian.....	23
3.4 Identifikasi Variabel Penelitian.....	24
3.4.1 Variabel Bebas.....	24
3.4.2 Variabel Terikat.....	24
3.4.3 Variabel Terkendali.....	27
3.5 Sampel Penelitian.....	28
3.5.1 Besar Sampel Penelitian.....	28
3.5.2 Kriteria Sampel Penelitian.....	28
3.6 Alat dan Bahan Penelitian.....	29
3.6.1 Alat Penelitian.....	29
3.6.2 Bahan Penelitian.....	30
3.7 Prosedur Penelitian.....	30
3.8 Pengamatan.....	35
3.9 Analisis Data.....	36
3.10 Alur Penelitian.....	38
BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN.....	39
4.1 Hasil Penelitian.....	39
4.1.1 Hiperlipidemia pada Hewan Coba.....	39
4.1.2 Histomorfometrik Lesi Aterosklerosis.....	39
4.1.3 Histomorfologik Lesi Aterosklerosis.....	42
4.2 Pembahasan.....	46

	Halaman
BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN	50
5.1 Kesimpulan	50
5.2 Saran	50
DAFTAR PUSTAKA	51
LAMPIRAN.....	57



DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 4.1 Rerata dan standar deviasi ketebalan dinding arteri karotis [<i>Intima-Media Thickness (IMT)</i>]	40
Tabel 4.2 Hasil uji beda One-way ANOVA ketebalan dinding arteri karotis [<i>Intima-Media Thickness (IMT)</i>]	40
Tabel 4.3 Hasil uji <i>Post-hoc test</i>	40
Tabel 4.4 Tabel Data Persentase Ateroma pada Arteri Karotis tikus wistar	42
Tabel 4.5 Tabel Data Persentase Deposisi Lipid.....	44



DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2.1 Cabang - cabang Mayor Arteri Karotis.....	6
Gambar 2.2 Histologi Arteri Karotis	7
Gambar 2.3 Patogenesis Aterosklerosis	9
Gambar 2.4 Potongan Melintang Arteri Normal dan Aterosklerosis	10
Gambar 2.5 Disfungsi endotel (lesi inisial) pada Aterosklerosis	11
Gambar 2.6 Disfungsi endotel (lesi II) pada Aterosklerosis	12
Gambar 2.7 Disfungsi endotel (lesi lanjutan) pada Aterosklerosis	13
Gambar 2.8 Jenis lipoprotein berdasarkan densitas.....	14
Gambar 2.9 Tanaman kopi robusta.....	18
Gambar 2.10 Biji kopi robusta	19
Gambar 2.11 Kerangka konsep	21
Gambar 3.1 Pengukuran Ketebalan Dinding Arteri Karotis	25
Gambar 3.2 Gambaran Ateroma pada Arteri Karotis Tikus	26
Gambar 3.3 Gambaran Histomorfologik Deposisi Lipid.....	27
Gambar 3.4 Alur Penelitian.....	38
Gambar 4.1 Nilai Rerata Ketebalan Dinding Arteri Karotis Tikus	41
Gambar 4.2 Gambaran histologi dinding arteri karotis tikus	43
Gambar 4.3 Pengamatan deposisi lipid pada arteri karotis tikus wistar	45

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran A. Alat dan Bahan Penelitian	57
A.1 Alat Penelitian.....	57
A.2 Bahan Penelitian.....	59
Lampiran B. Prosedur Penelitian.....	61
B.1 Adaptasi Hewan Coba	61
B.2 Pembuatan Pakan Tinggi Kolesterol dan Seduhan Kopi.....	61
B.3 Proses Pembedahan Hewan Coba	62
B.4 Proses <i>Frozen Section</i>	62
B.5 Proses Pengecatan Jaringan	63
Lampiran C. Data Hasil Penelitian	64
C.1 Hasil Pengamatan Histometrik Lesi Aterosklerosis	64
C.2 Hasil Pengamatan Histomorfologik Lesi Aterosklerosis.....	65
C.3 Hasil Pemeriksaan Kadar LDL pada tikus wistar hari ke-29.....	67
Lampiran D. Hasil Uji Statistik	68
D.1 Hasil Uji Statistik Parameter Histometrik (Ketebalan Dinding Arteri Karotis)	68
Lampiran E. Gambaran Histologi Lesi Aterosklerosis Karotis.....	70
E.1 Ketebalan Dinding Arteri Karotis.....	70
E.2 Gambaran Histomorfologik Lesi Aterosklerosis Karotis.....	73
Lampiran F. Sertifikat <i>Ethical Clearance</i> Penelitian.....	74
Lampiran G. Surat Ijin Penelitian.....	75

BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar belakang

Aterosklerosis karotis merupakan penyebab stroke (penyakit serebrovaskular) yang saat ini menempati urutan ketiga sebagai penyebab utama kematian setelah penyakit jantung koroner dan kanker di negara-negara berkembang. Data menunjukkan bahwa stroke menempati urutan pertama sebagai penyebab kematian utama semua umur di Indonesia (Abdullah, 2010). Pada tahun 2008 sedikitnya 6,15 juta jiwa kematian disebabkan oleh stroke dan penyakit serebrovaskuler (*World Health Organization*, 2011). Penyakit serebrovaskuler ini diantaranya disebabkan oleh adanya proses aterosklerosis (Waller, 2010).

Aterosklerosis merupakan suatu kelainan yang terdiri atas pembentukan fibrolipid lokal di dalam pembuluh darah membentuk plak-plak yang menonjol atau penebalan yang disebut ateroma yang terdapat di dalam tunika intima dan pada bagian dalam tunika media, ateroma kemudian berkembang dan dapat mengalami berbagai komplikasi termasuk kalsifikasi, perdarahan, ulserasi dan trombosis (Daniels, 2008). Aterosklerosis yang terjadi pada arteri karotis dapat menyebabkan ruptur dan menimbulkan trombus, selanjutnya akan menyebabkan gangguan peredaran darah ke otak, sehingga terjadi iskemia dan kematian jaringan di otak. Hal ini dikenal sebagai penyakit stroke iskemik (Price dan Wilson, 2003). Aterosklerosis merupakan proses inflamasi yang bersifat progresif yang disebabkan oleh multifaktor, salah satunya yaitu kenaikan kadar *Low Density Lipoprotein* (LDL) yang merupakan ketidakseimbangan kadar lemak dalam darah atau dikenal dengan Hiperlipidemia. Pada penelitian sebelumnya disimpulkan bahwa *Hyper-Low Density Lipoproteinemia* (Hyper-LDL) dapat meningkatkan risiko terjadinya aterosklerosis yang ditandai adanya plak dan penebalan dinding arteri pembuluh darah (Aini, 2016).

Peningkatan kadar LDL dalam darah merupakan zat toksik yang dapat meningkatkan produksi zat-zat oksigen reaktif (ROS). Peningkatan produksi ROS yang tidak seimbang dengan antioksidan menimbulkan stres oksidatif yang dapat

menyebabkan menurunnya fungsi sel endotel (disfungsi endotel). Fungsi endotel sebagai barier permeabilitas terganggu sehingga tidak dapat berfungsi sebagai barier yang efektif terhadap pergerakan lipoprotein ke dalam dinding pembuluh darah. Meningkatnya permeabilitas endotel memberikan jalan masuk bagi LDL ke tunika intima. Di dalam tunika intima LDL akan mengalami oksidasi menjadi *Oxidize-LDL* (Ox-LDL) akibat paparan radikal bebas dari zat-zat oksigen reaktif. Hal inilah yang menyebabkan LDL akan terakumulasi di dalam pembuluh darah (Peter dan Libby, 2012). Disfungsi endotel juga dapat menyebabkan peningkatan sekresi sitokin pro-inflamasi yang dapat meningkatkan ekspresi molekul adhesi sel. Monosit sebagai salah satu sel inflamasi juga memiliki reseptor terhadap molekul adhesi tersebut sehingga monosit akan melekat pada endotel kemudian bermigrasi menembus ke dalam tunika intima, menjadi makrofag yang akan memfagosit Ox-LDL dan berubah menjadi *foam cell* atau sel busa. Timbunan *foam cell* pada tunika intima, bertambahnya jumlah monosit dan makrofag, serta terbentuknya matriks ekstraseluler menyebabkan penebalan tunika intima-media dan pembentukan ateroma (Setia, 2014).

Kopi (*Coffea Sp.*) merupakan komoditas perkebunan yang paling akrab dengan masyarakat, mulai dari kalangan ekonomi atas hingga bawah (Sukohardik, 2011). Ada tiga spesies kopi yang dibudidayakan di Indonesia yaitu kopi arabika (*Coffea arabika*), kopi robusta (*Coffea canephora*), dan kopi liberika (*Coffea liberica*) (Rahardjo, 2012). Kandungan kafein pada biji kopi robusta (*Coffea canephora*) dua kali lebih banyak daripada biji kopi arabika, dan kandungan asam klorogenat pada biji kopi robusta (*Coffea canephora*) lebih banyak dari pada tanaman obat lainnya (Ciptaningsih, 2012). Biji kopi robusta (*Coffea canephora*) mengandung senyawa aktif, yakni polifenol dan alkaloid. Senyawa polifenol (asam klorogenat) dalam biji kopi robusta (*Coffea canephora*) memiliki efek sebagai antiinflamasi dan antioksidan, senyawa alkaloid (kafein) memiliki efek sebagai antioksidan sehingga mampu melindungi tubuh dari efek radikal bebas (Ciptaningsih, 2012).

Kandungan polifenol dan alkaloid yang memiliki efek antiinflamasi dan antioksidan dalam kopi robusta (*Coffea canephora*) diduga dapat menghambat

pembentukan lesi aterosklerosis pada arteri karotis. Penelitian eksperimental mengenai efek pemberian seduhan kopi robusta (*Coffea canephora*) terhadap pembentukan lesi aterosklerosis pada arteri karotis masih sedikit dilakukan. Oleh karena itu, peneliti ingin mempelajari tentang efek seduhan kopi robusta (*Coffea canephora*) terhadap pembentukan lesi aterosklerosis karotis pada tikus wistar yang mengalami hiperlipidemia.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan keterkaitan hiperlipidemia terhadap terbentuknya lesi aterosklerosis serta efek antioksidan dan antiinflamasi kopi robusta (*Coffea Canephora*), maka didapatkan rumusan masalah yaitu apakah pemberian kopi robusta (*Coffea canephora*) dapat menghambat pembentukan lesi aterosklerosis karotis pada tikus wistar (*Rattus norvegicus*) hiperlipidemia?

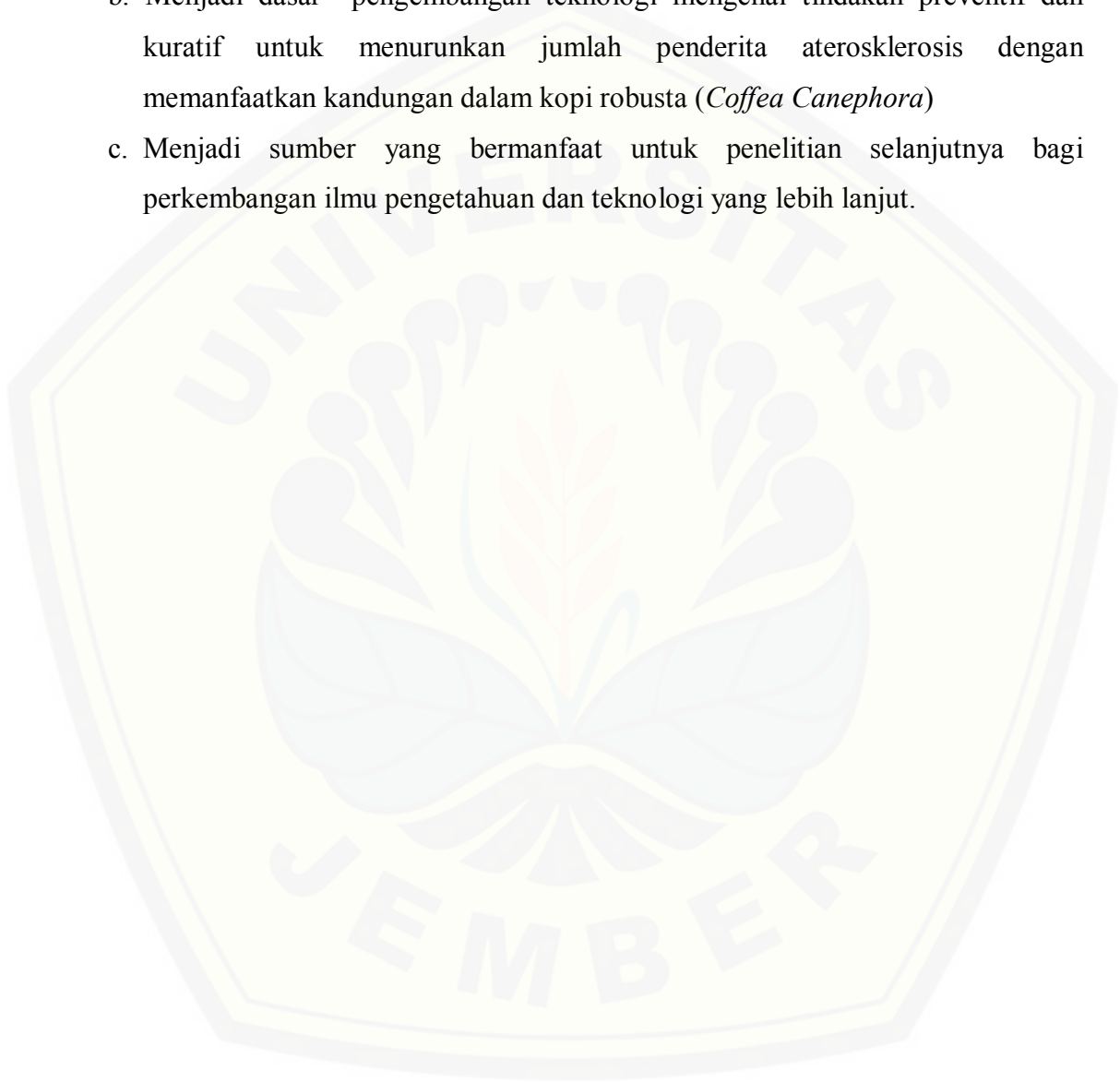
1.3 Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi lesi aterosklerosis karotis pada model tikus hiperlipidemia yang diberi seduhan kopi robusta (*Coffea Canephora*)

1.4 Manfaat Penelitian

Hasil penelitian ini diharapkan dapat:

- a. Meningkatkan pengetahuan mengenai pengaruh pemberian kopi robusta dengan pembentukan lesi aterosklerosis karotis oleh karena hiperlipidemia
- b. Menjadi dasar pengembangan teknologi mengenai tindakan preventif dan kuratif untuk menurunkan jumlah penderita aterosklerosis dengan memanfaatkan kandungan dalam kopi robusta (*Coffea Canephora*)
- c. Menjadi sumber yang bermanfaat untuk penelitian selanjutnya bagi perkembangan ilmu pengetahuan dan teknologi yang lebih lanjut.



BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Arteri Karotis

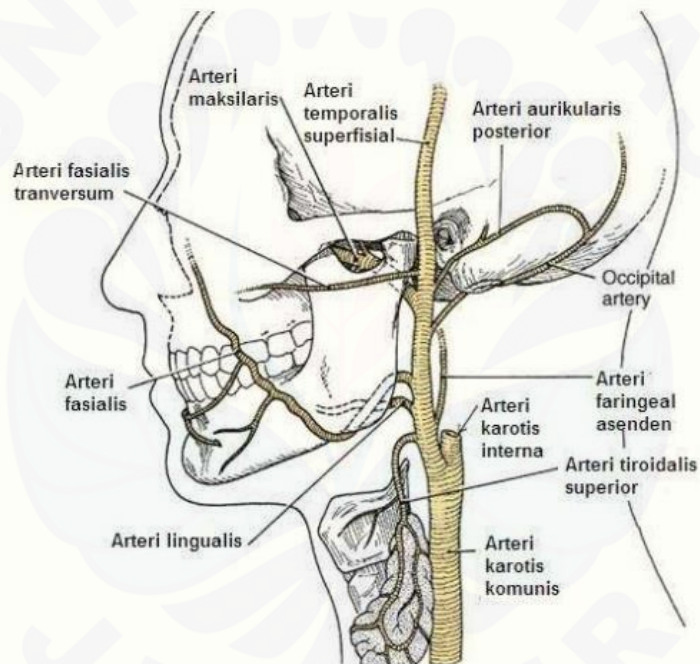
Arteri karotis merupakan pembuluh darah yang memberikan suplai darah ke daerah leher, kepala, dan otak. Arteri karotis berjalan di sisi kanan dan kiri leher, yang bercabang menjadi arteri karotis interna dan arteri karotis eksterna kurang lebih setinggi kartilago tiroid (Gambar 2.1). Arteri karotis interna masuk ke tengkorak untuk memasok darah ke otak dan mata. Sedangkan, arteri karotis eksterna memiliki beberapa cabang yang memasok darah ke jaringan dari, kulit kepala, mulut, wajah, dan rahang (Muttaqin, 2008).

Bifurkasi arteri karotis merupakan daerah yang rawan akan terbentuknya plak aterosklerotik. Hal ini dikarenakan adanya pola aliran darah yang kompleks saat membawa darah beserta komponen aterosklerotik melewati daerah bifurkasi tersebut. Aliran darah yang berada didekat pusat percabangan arteri mengalir dengan pola laminar, sedangkan aliran darah didekat intima mengalir dengan pola turbulen dan lebih lambat. Dinding arteri yang menerima tekanan aliran darah lebih lambat ($< 4 \text{ dyn/cm}^2$) terbukti mudah terinduksi cedera endotel karena mengalami peningkatan permeabilitas intraseluler dan peningkatan waktu keberadaan partikel aterosklerotik di daerah tersebut (Hall dan Bassiouny, 2012).

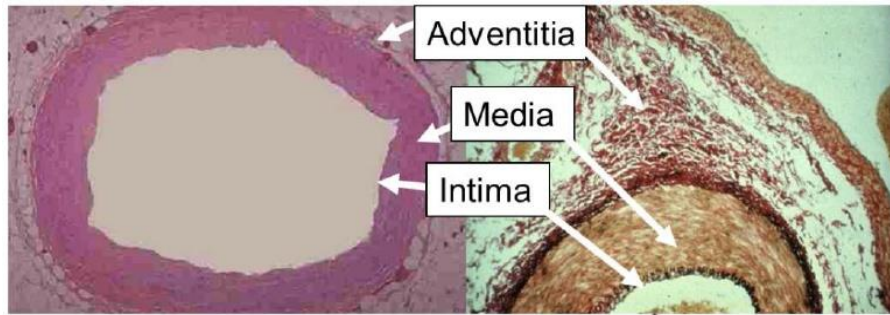
Gambaran struktur mikroskopis dinding arteri karotis dari arah dalam keluar dinding adalah sebagai berikut (Gambar 2.2):

- a. Tunika intima (tunika interna) sebagai lapisan dalam yang terdiri dari selapis sel-sel endotel. Di bawah lamina endotel terdapat jaringan ikat yang sangat tipis, tidak jelas disebut lamina subendotel. Pada lamina subendotel dijumpai serabut-serabut elastik yang tampak kurang jelas. Pada batas tunika intima dengan tunika media terdapat membran yang terdiri dari serabut-serabut elastik yang terlihat lebih jelas, bergelombang dengan arah sirkuler disebut sebagai membran elastika internal.

- b. Tunika media adalah lapisan serabut otot polos yang mempunyai arah sirkuler dengan susunan serabut-serabut yang rapat dan diantaranya terdapat serabut-serabut elastik. Lapisan ini dua kali lebih tebal dibanding dengan tunika intima.
- c. Tunika adventitia menyelubungi tunika media dari sebelah luar, terdiri dari jaringan ikat fibroelastik yang lebih tipis dari tunika media. Terdapat lamina elastika eksterna sebagai batas tunika media dan tunika adventitia, namun lapisan ini tidak setebal dan sejelas lamina elastika interna (Suryohudoyo, 2010).



Gambar 2.1 Cabang - cabang Mayor Arteri Karotis (Goetz, 2007)



Gambar 2.2 Gambaran histologis Arteri Karotis (Boston University Public Health, 2015)

2.2 Aterosklerosis

2.2.1 Definisi

Aterosklerosis berasal dari kata atero yang dalam bahasa Yunani disebut *atera* yang artinya adalah suatu bentuk yang menunjukkan degenerasi lemak atau hubungan dengan ateroma. Sklerosis dalam bahasa Yunani artinya adalah indurasi dan pengerasan, seperti pengerasan karena peradangan, pembentukan jaringan ikat yang meningkat (Dorland, 2006).

Aterosklerosis merupakan suatu kelainan yang terdiri atas pembentukan fibrolipid lokal di dalam bentuk plak-plak yang menonjol atau penebalan yang disebut ateroma yang terdapat di dalam tunika intima dan pada bagian dalam tunika media, ateroma kemudian berkembang, dan dapat mengalami berbagai komplikasi termasuk kalsifikasi, perdarahan, ulserasi dan trombosis (Daniels, 2008).

2.2.2 Etiologi Aterosklerosis

Etiologi dari aterosklerosis masih belum dapat diketahui, tetapi ada multi faktor yang terlibat berkontribusi dalam perkembangan plak aterosklerosis. Faktor-faktor yang mempengaruhi proses ini dapat menghambat atau mempercepat aterosklerosis. Faktor risiko yang paling umum adalah riwayat keluarga, hiperlipidemia, diabetes mellitus, merokok, hipertensi, dan kekurangan makanan yang mengandung antioksidan (Ladich dan Elena, 2015).

Aterosklerosis juga digolongkan sebagai penyakit penuaan, sehingga bertambahnya usia merupakan faktor risiko independen untuk perkembangan aterosklerosis. Aterosklerosis ini juga terkait dengan penuaan biologis dini, plak aterosklerotik menunjukkan penuaan seluler ditandai dengan turunnya proliferasi

sel, arteri menjadi ireversibel dan apoptosis, kerusakan DNA yang tinggi, modifikasi epigenetik dan pemendekan telomer (Wang dan Bennet, 2012).

2.2.3 Patogenesis Aterosklerosis

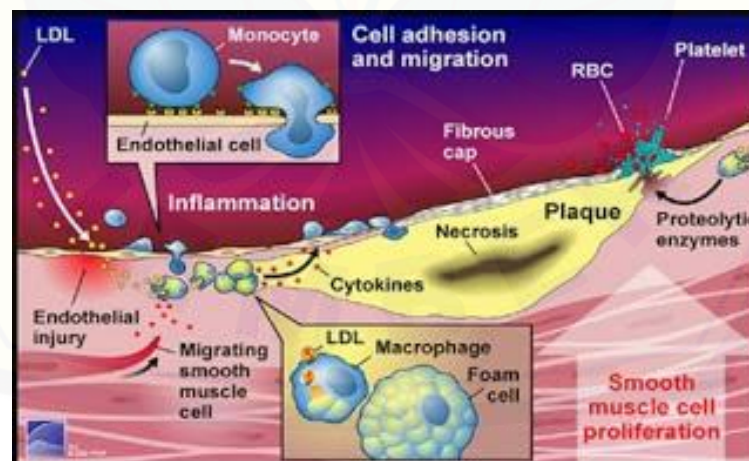
Proses aterosklerosis dimulai dari timbulnya lesi tipis akibat terbentuknya sel-sel busa (*foam cell*), menebalnya dinding arteri karena adanya jejas, reaksi proliferasi, dan deposisi lemak pada daerah jejas. Kadar *Low Density Lipoprotein* (LDL) yang tinggi merupakan *injury* utama endotel. Adanya zat-zat toksik (*hyper-LDL*) dapat meningkatkan produksi zat-zat oksigen reaktif (*ROS/Reactive Oxygen Spesies*) dari endotel. *Reactive Oxygen Spesies* atau ROS merupakan senyawa pengoksidasi turunan oksigen yang bersifat sangat reaktif. Tubuh manusia dapat menetralkan radikal bebas ini, hanya saja bila jumlahnya melebihi kemampuan antioksidan seluler maka akan merusak sel itu sendiri, hal ini yang disebut dengan stress oksidatif (Suryohudoyo, 2010).

Peningkatan produksi ROS yang tidak seimbang dengan antioksidan yang ada dapat mempengaruhi fungsi metabolik dan sintesis endotel sehingga mengganggu fungsi sel endotel (disfungsi endotel) yang dapat mengganggu homeostasis endotel, sehingga dapat menyebabkan: rusaknya fungsi endotel sebagai barrier permeabilitas, pelepasan sitokin inflamasi, peningkatan produksi molekul adhesi, terganggunya pelepasan zat-zat vasoaktif (nitrit oksida), dan terganggunya sifat antitrombotik, yang memicu respon inflamasi dalam dinding arteri (Libby dkk., 2010).

Fungsi dari endothelium dipengaruhi oleh ROS yang dapat menginaktivasi *Nitric Oxide* (degradasi NO). Faktor ini dapat menginduksi perubahan profil ekspresi gen pada endotel dan otot polos pembuluh darah yang menyebabkan fenotipe proaterosklerotik pembuluh darah. Degradasi NO akan menyebabkan disfungsi vasomotor, aktivasi endotel mengekspresikan molekul adhesi, proliferasi otot polos menginduksi, ekspresi gen inflamasi, menginduksi apoptosis, migrasi dan reorganisasi matrik seluler yang dapat mengganggu vasorelaksasi yang tergantung endotel, hal tersebut merupakan mekanisme yang mengawali perkembangan aterosklerosis (Maslachah dkk, 2008).

Saat terjadi inflamasi, monosit dan LDL akan berinfiltrasi ke dinding pembuluh darah. Monosit masuk ke tunika intima dibantu dengan molekul adhesi *Vascular Cell Adhesion Molecule* (VCAM-1). Monosit yang masuk ke tunika intima berubah menjadi makrofag, sedangkan LDL mengalami modifikasi oleh aktivitas *Reactive Oxygen Spesies* (ROS) (hasil dari stimulasi *nitric oxide* dan enzim *lipoxigenase*) menjadi LDL teroksidasi (LDL-oks). Makrofag memfagosit LDL-oks melalui reseptor *scavenger* sehingga terbentuk sel busa (*foam cell*) (Hansson, 2005).

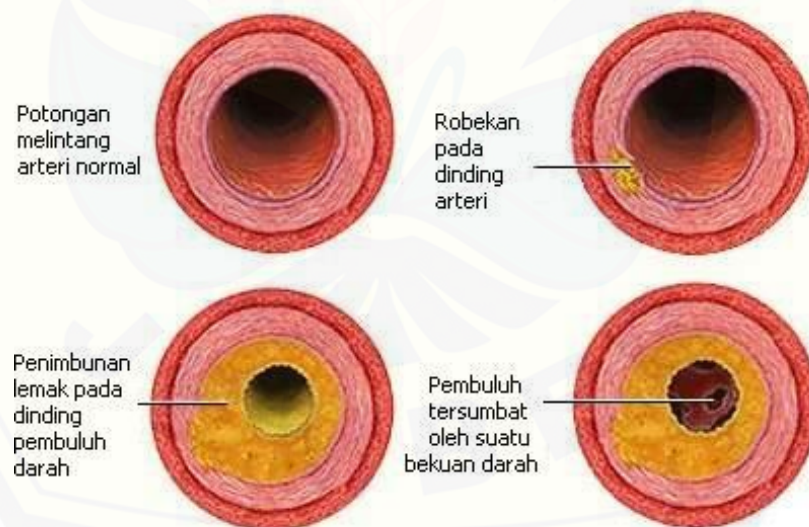
Nekrosis sel busa diakibatkan oleh sitotoksis dari LDL-oks membentuk lipid ekstra seluler dan merupakan transisi dari garis lemak menjadi lesi aterosklerosis lanjut (Gambar 2.3). Seiring dengan makin matangnya lesi, terjadi pembatasan aliran darah, dan *remodeling* vaskular. Setelah itu terjadi perbaikan plak dan dirupsi berulang yang menyebabkan rentan timbulnya ruptur plak. Rupturnya plak dipermudah oleh pelepasan enzim proteolitik (metalloprotease) oleh makrofag. Ateroma yang ruptur melepaskan bahan-bahan trombogenik ke dalam sirkulasi, menyebabkan pembentukan trombus di atas ulkus intima (Gambar 2.4) (Kumar, 2007).



Gambar 2.3 Patogenesis Aterosklerosis (Cefalu, 2006)

Reaksi terhadap *endothelial injury* merupakan salah satu teori yang menerangkan tentang proses aterosclerosis. Aterosclerosis merupakan suatu respon terhadap inflamasi yang kronik pada dinding arteri yang diawali dengan adanya jejas pada endotel. Proses tersebut yaitu:

- a. *Injury* endotel yang kronik.
- b. Terjadinya disfungsi endotel, perlekatan monosit dan platelet ke endotel pembuluh darah, dan monosit mengalami migrasi dari lumen ke lapisan intima.
- c. Sel-sel otot polos mengalami migrasi dari lapisan media ke intima. Makrofag mengalami aktivasi.
- d. Makrofag dan sel otot polos memakan lemak, sehingga menimbulkan penumpukan lemak, terutama pada intima.
- e. Timbul plak, proliferasi otot polos serta penumpukan *extracellular matrix*, kolagen, dan *extracellular lipid* (Agus dan Yanti, 2010).



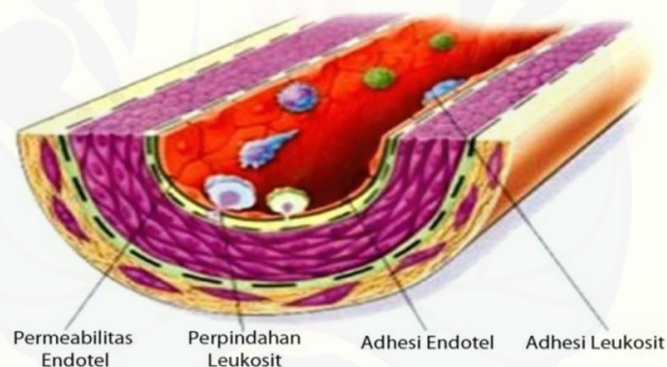
Gambar 2.4 Potongan melintang arteri normal dan arteri dengan aterosclerosis, terdapat ruptur pada plak dan pembentukan trombus pada dinding pembuluh darah (Ross, 2004).

2.2.4 Tipe-tipe Lesi Aterosklerosis

Lesi aterosklerosis, terutama terjadi pada arteri elastis berukuran sedang dan besar serta arteri muskularis, dapat menimbulkan iskemi jantung, otak atau ekstremitas yang menyebabkan terjadinya infark. *The American Heart Association Commitee on Vascular Lesion* menentukan klasifikasi perkembangan lesi ini menjadi 6 (enam) fase. Sistem klasifikasi ini berkaitan dengan fase klinis dari pembentukan lesi aterosklerosis (Ross, 2004).

a. Lesi Aterosklerosis tipe I

Lesi aterosklerosis tipe I atau *Initial lesion* memperlihatkan perubahan dini yang pertama kali bisa dideteksi secara mikroskopik. Pengamatan dengan menggunakan mikroskop memperlihatkan adanya penambahan sejumlah sel busa pada lapisan tunika intima dan penebalan adaptif tunika intima, terutama di regio yang mudah terkena (Gambar 2.5) (Ross, 2004).

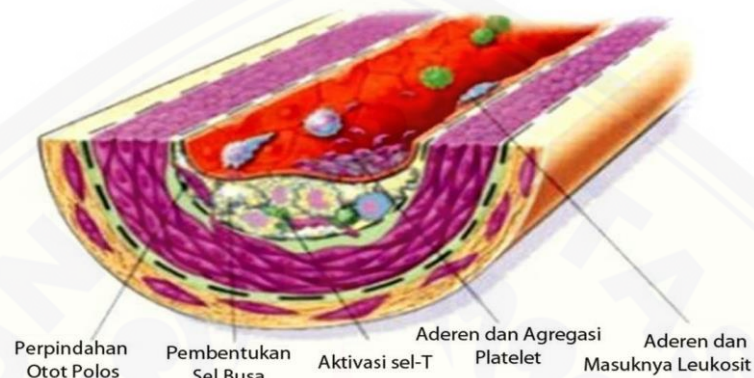


Gambar 2.5 Disfungsi endotel (lesi inisial) pada aterosklerosis (Ross, 2004)

b. Lesi Aterosklerosis tipe II

Lesi tipe II (garis lemak) berupa garis-garis, bercak atau bintik berwarna kuning di permukaan tunika intima. Secara histologis, lesi aterosklerosis tipe II terdiri atas miosit berisi butiran lemak, sel limfosit T, sel busa berlapis, sejumlah besar makrofag tanpa butiran lemak, dan sel mast di permukaan tunika intima, disertai butiran heterogen lipid ekstrasel. Garis lemak mulanya terdiri atas monosit makrofag, dan limfosit T yang mengandung sel busa yang bergabung dengan sejumlah sel miosit. Tahapan pembentukan garis lemak (Gambar 2.6) meliputi; (1) migrasi miosit yang distimulasi oleh *Platelet Derivied Grow Factor*,

Fibroblast Grow Factor 2 dan TGF, (2) aktivasi sel T yang diperantai oleh TNF-, IL-2 dan *Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor*, (3) pembentukan sel busa yang diperantai oleh LDL-oks, TNF- α , *Macrophage Colony Stimulating Factor*, IL-1, (4) adhesi dan agregasi platelet yang dirancang oleh integrin, trombosan A2, P-selektin, fibrin, faktor jaringan dan faktor lain (Ross, 2004).



Gambar 2.6 Disfungsi endotel (lesi II) pada aterosklerosis (Ross, 2004)

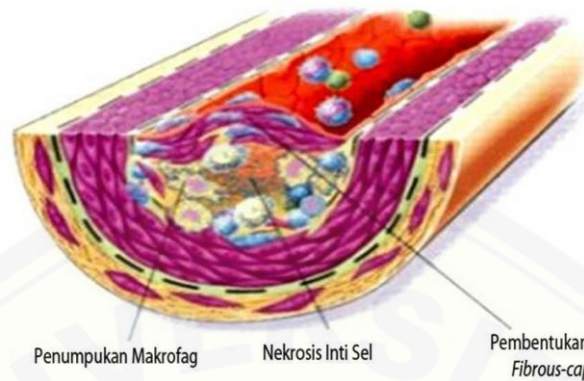
c. Lesi Aterosklerosis tipe III

Lesi tipe III disebut juga lesi intermedia atau lesi transisional atau lesi preateroma. Lesi ini merupakan jembatan morfologis dan kimiawi antara lesi tipe II dan lesi tipe lanjut (tipe IV). Lesi ini memiliki gambaran histopatologis yang khas, yaitu adanya timbunan dan partikel lipid ekstrasel yang identik dengan lesi tipe II pada lapisan miosit mengalami penebalan adaptif tunika intima. Timbunan lipid yang lebih banyak dan tebal terletak tepat di bawah lapisan makrofag dan sel busa, menggantikan serabut proteoglikan intersel dan matriks, serta mendorong dan memisahkan miosit (Ross, 2004).

d. Lesi Aterosklerosis tipe lanjut (IV, V dan VI)

Lesi lanjut (tipe IV, V, VI) menunjukkan adanya lipid ekstrasel yang besar untuk merusak tunika intima, serta terdapat mekanisme trombotik yang lebih menonjol dalam mempercepat terjadinya aterosklerosis. Pada lesi tingkat akhir (lesi tipe VI) deposit lipid telah memodifikasi jaringan sampai ke tunika media dan adventitia. Lesi ini juga membentuk sumbatan fibrosa yang memisahkan lesi

dengan lumen arteri. Sumbatan fibrosa menutupi leukosit, lipid, dan debris yang membentuk inti nekrosis (Gambar 2.7) (Ross, 2004).



Gambar 2.7 Disfungsi endotel (lesi lanjutan) pada aterosklerosis (Sumber: Ross, 2004)

2.3 Hiperlipidemia

2.3.1 Definisi Hiperlipidemia

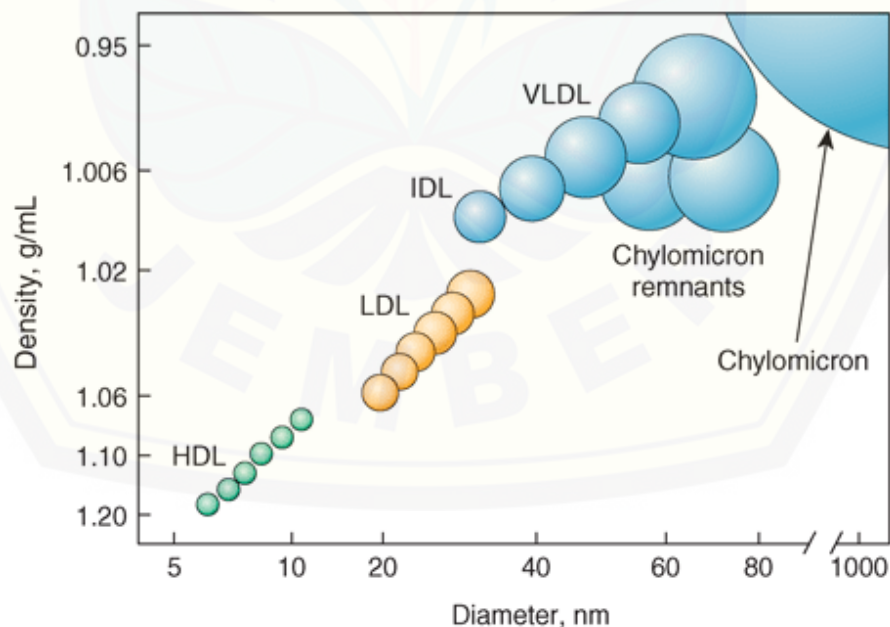
Hiperlipidemia (Hiperlipoproteinemia) adalah tingginya kadar lemak (kolesterol, trigliserida maupun keduanya) dalam darah. Lemak (disebut juga lipid) adalah zat yang kaya energi, yang berfungsi sebagai sumber energi utama untuk proses metabolisme tubuh. Lemak diperoleh dari makanan atau dibentuk di dalam tubuh, terutama di hati dan bisa disimpan di dalam sel-sel lemak untuk digunakan di kemudian hari. Sel-sel lemak juga melindungi tubuh dari dingin dan membantu melindungi tubuh terhadap cedera. Lemak merupakan komponen penting dari selaput sel, selubung saraf yang membungkus sel-sel saraf serta empedu (LIPI, 2009).

Dua lemak utama dalam darah adalah kolesterol dan trigliserida. Lemak mengikat dirinya pada protein tertentu sehingga bisa mengikuti aliran darah; gabungan antara lemak dan protein ini disebut lipoprotein. Lipoprotein merupakan kompleks antara lipid dengan protein yang dapat larut di dalam plasma darah, sehingga lipoprotein bertugas mengangkut lipid yang berasal dari sumber endogen maupun eksogen menuju ke jaringan untuk di oksidasi dan disimpan. Lipoprotein mengangkut lipid dari usus sebagai kilomikron dan dari hati sebagai lipoprotein berdensitas sangat rendah atau *Very Low Density Lipoprotein* (VLDL). Partikel

lipoprotein terdiri dari bagian inti yang mengandung trigliserida dan ester kolesterol serta dikelilingi oleh fosfolipid, kolesterol bebas, dan apolipoprotein (Suyatna, 2007).

Apolipoprotein berperan dalam biogenesis, transportasi dan metabolisme protein plasma. Secara garis besar apolipoprotein mengarahkan lipoprotein ke tempat metabolismenya dengan cara mengikat lipoprotein pada enzim khusus dan mengangkut protein pada membran sel, sebagai bahan baku hormon steroid dan juga berperan dalam pengambilan bahan dari perifer sehingga tidak terjadi penumpukan yang berpotensi terhadap aterosklerosis (Wiranti, 2014).

Setiap kelas lipoprotein terdiri dari partikel dengan densitas, ukuran, dan komposisi protein yang berbeda-beda. Densitas lipoprotein ditentukan oleh jumlah lipid per partikel. Kolesterol HDL merupakan lipoprotein yang paling kecil dan padat, sedangkan kilomikron dan VLDL yaitu lipoprotein yang paling besar dan kurang padat. Umumnya trigliserida plasma ditranspor dalam kilomikron atau VLDL, dan kebanyakan kolesterol plasma diangkut sebagai kolesterol teresterifikasi dalam LDL dan HDL (Gambar 2.8) (Jim, 2013).



Gambar 2.8 Jenis lipoprotein berdasarkan densitas (Adam, 2010).

Lipoprotein yang utama adalah :

1. Kilomikron

Kilomikron merupakan partikel yang mengandung 2% protein dan 98% lemak (84 % trigleserida, 7% kolesterol, dan 7% fosfolipid). Fungsi kilomikron adalah membawa trigliserida (lemak) dari usus ke hati, ke otot rangka, dan ke jaringan adiposa dan tidak berpengaruh dalam proses ateroklerosis (Tomkin, 2012).

2. VLDL (*Very Low Density Lipoproteins*)

Very Low Density Lipoprotein merupakan alat pengangkut utama trigliserida yang mengandung 85 % protein, 90% lemak (50% trigliserida, 20%, kolesterol, 9% fosfolipid) dan 2% lemak bebas dibentuk di hati dan sebagian di usus (Brunton, 2008).

3. LDL (*Low Density Lipoproteins*)

Low Density Lipoproteins mengandung 21% protein, 78% lemak (11% trigliserida, 45% kolesterol, 22% fosfolipid dan 2% lemak bebas) yang dibentuk dari VLDL dan IDL. LDL bertugas untuk menyediakan kolesterol ke seluruh tubuh untuk kelangsungan hidup sel dan menyediakan kolesterol untuk sintesis hormon steroid (Tomkin, 2012).

4. IDL (*Intermediate Density Lipoproteins*)

Intermediate Density Lipoproteins kurang mengandung trigliserida, namun lebih banyak mengandung kolesterol dan relatif lebih banyak mengandung apoprotein B dan E. *Intermediate Density Lipoprotein* berfungsi untuk mengangkut kolesterol keseluruhan tubuh dan berguna untuk sistesis membran dan hormon steroid. IDL memiliki jumlah sedikit di dalam plasma, namun akan terjadi peningkatan ketika terjadi proses penghambatan VLDL menjadi LDL (Suyatna, 2007).

5. HDL (*High Density Lipoproteins*)

High Density Lipoprotein memiliki ukuran yang sangat kecil yang mengandung 50% protein, 20% kolesterol dan 30% fosfolipid. Dibentuk oleh sel hati dan usus, fungsinya mentransfer kolesterol dari perifer ke hati

dimana zat tersebut di metabolisme dan dieksresi (Brunton, 2008). HDL berperan dalam *reverse-cholesterol transport* dan juga mencegah oksidasi LDL (Tomkin, 2012).

Pembentukan LDL oleh reseptor LDL penting dalam pengontrolan kolesterol darah. Selain itu, di dalam pembuluh darah terdapat sel-sel rusak yang dapat merusak LDL. Melalui jalur sel-sel rusak ini, molekul LDL akan dioksidasi sehingga tidak dapat masuk lagi ke dalam aliran darah. Namun karena adanya faktor risiko terhadap peningkatan LDL seperti diet tinggi kolesterol atau tinggi asam lemak jenuh, penambahan berat badan, proses penuaan, dan faktor genetik dapat menyebabkan LDL menumpuk di dalam sel-sel rusak. Apabila reseptor LDL terganggu, maka LDL dalam darah akan meningkat lalu dibawa ke aliran darah. Hal ini menyebabkan peningkatan kolesterol LDL dalam darah (*hyper-LDL*) sehingga HDL tidak dapat mengangkut timbunan lemak di dalam tubuh ke hati (Bays, 2013).

2.4 Kopi Robusta (*Coffea canephora*)

2.4.1 Klasifikasi Tanaman Kopi Robusta (*Coffea canephora*)

Taksonomi tanaman kopi robusta adalah sebagai berikut: Kingdom *Plantae*, Sub Kingdom *Tracheobionta*, Super Divisi *Spermatophyta*, Divisi *Magnoliophyta*, Kelas *Magnoliopsida*, Sub Kelas *Asteridae*, Ordo *Rubiales*, Famili *Rubiaceae*, Genus *Coffea*, Spesies *Coffea canephora* (Armansyah 2010).

2.4.2 Habitat Tanaman Kopi Robusta (*Coffea canephora*)

Kopi merupakan salah satu jenis tanaman perkebunan yang sudah lama dibudidayakan dan memiliki nilai ekonomis yang tinggi. Kopi berasal dari Afrika, yaitu daerah pegunungan di Etiopia. Namun, kopi sendiri baru dikenal oleh masyarakat dunia setelah tanaman tersebut dikembangkan di luar daerah asalnya (Rahardjo, 2012). Kopi di Indonesia saat ini umumnya dapat tumbuh baik pada ketinggian tempat di atas 700 m di atas permukaan laut (dpl). Lahan perkebunan kopi yang tersedia di Indonesia sampai saat ini sebagian besar berada di ketinggian antara 700 sampai 900 mdpl. Mungkin hal ini yang menyebabkan

mengapa sebagian besar (sekitar 95%) jenis kopi di Indonesia saat ini adalah kopi robusta (*C. canephora*). Selain itu, curah hujan yang sesuai untuk kopi seyogyanya adalah 1500–2500 mm per tahun, dengan rerata bulan kering 1-3 bulan dan suhu rerata 15-25 °C (Syakir, 2010).

Kopi merupakan tanaman perkebunan yang tergolong dalam tanaman tahunan. Indonesia merupakan salah satu negara dengan produksi kopi terbesar di dunia. Provinsi Jawa Timur merupakan daerah lumbung kopi nasional, terutama kabupaten Jember. Produksi kopi robusta (*C. canephora*) yang dikelola masyarakat umum atau perkebunan rakyat di Jember pada tahun 2004 mencapai 21.738 kwintal dengan luas lahan 5.481 ha dalam setahun jumlah tersebut terus mengalami kenaikan signifikan hingga mencapai 100-200 ton per tahun 2007. Kopi perkebunan rakyat tersebut tersebar di beberapa kecamatan, terutama di Kalisat dan Silo. Selama ini, kopi rakyat tersebut sering dikirim keluar daerah untuk menjadi kemasan kopi yang lebih mempunyai nilai ekonomi yang tinggi (Yahmadi, 2007). Kabupaten Jember telah memiliki Pusat Penelitian Kopi dan Kakao sehingga kopi robusta yang dihasilkan berkualitas baik (Prajitiasari, 2013).

2.4.3 Strukur Biji Kopi Robusta (*Coffea canephora*)

Buah kopi yang sudah masak umumnya berwarna kuning kemerahan sampai merah tua (merah kehitaman bila lewat masak), tetapi ada pula yang belum cukup tua sudah berwarna kuning kemerahan pucat yaitu buah kopi yang terserang hama bubuk buah kopi (Gambar 2.9). Buah kopi biasanya memiliki dua keping biji, tetapi juga ada yang hanya mengandung satu keping biji saja bahkan ada yang tidak mempunyai keping biji sama sekali yang disebut kopi gabug (Kustantini, 2014).



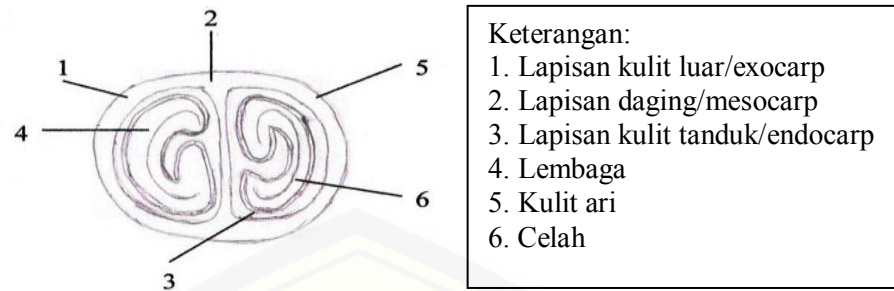
Gambar 2.9 Tanaman kopi robusta (Syakir, 2010).

Struktur biji kopi robusta (Gambar 2.10) terdiri atas:

1. Kulit luar (*exocarp*): merupakan bagian terluar dari buah kopi yang terdiri atas lapisan tipis, liat, dan pada buah yang masih muda akan berwarna hijau tua lalu berangsur-angsur berwarna hijau kuning, kuning, merah hingga merah kehitaman.
2. Lapisan daging buah (*mexocarp*): merupakan daging buah yang berlendir dan rasanya agak manis apabila sudah masak.
3. Lapisan kulit tanduk (*endocarp*): merupakan kulit bagian dalam dengan struktur cukup keras dan disebut kulit tanduk.
4. Putih lembaga /*endosperm* terdapat lembaga (embrio).
5. Kulit ari / kulit biji.
6. Celah merupakan rongga kosong berupa saluran memanjang sepanjang ukuran biji (Kustantini, 2014).

Komposisi buah kopi adalah sebagai berikut:

- a. 40 % terdiri dari *pulp*,
- b. 20 % lendir (*mucilage*) dan
- c. 40 % adalah biji kopi dan kulit majemuk (Kustantini, 2014).



Gambar 2.10 Penampang melintang biji kopi robusta (Kustantini, 2014).

2.4.4 Kandungan Biji Kopi Robusta (*Coffea canephora*)

Biji kopi secara alami mengandung 3 senyawa aktif polifenol, alkaloid, saponin dan berbagai jenis senyawa volatil, seperti aldehida, furfural, keton, alkohol, ester, asam format dan asam asetat. Selain itu, dalam biji kopi juga terdapat kandungan trigoneline, asam klorogenik, glikosida, mineral dan kafein (Widyotomo, 2007).

Buah kopi banyak mengandung senyawa polifenol, seperti: asam klorogenik, trigoneline, asam kafein, asam ferulik, dan asam p-coumaric. Polifenol tergabung dalam molekul gula yang melindungi kelompok antioksidan. Penyangraian membuat komposisi senyawa polifenol berubah. Kandungan asam klorogenat pada biji kopi mencapai 14 % (berat kering) (Richelle dkk., 2001).

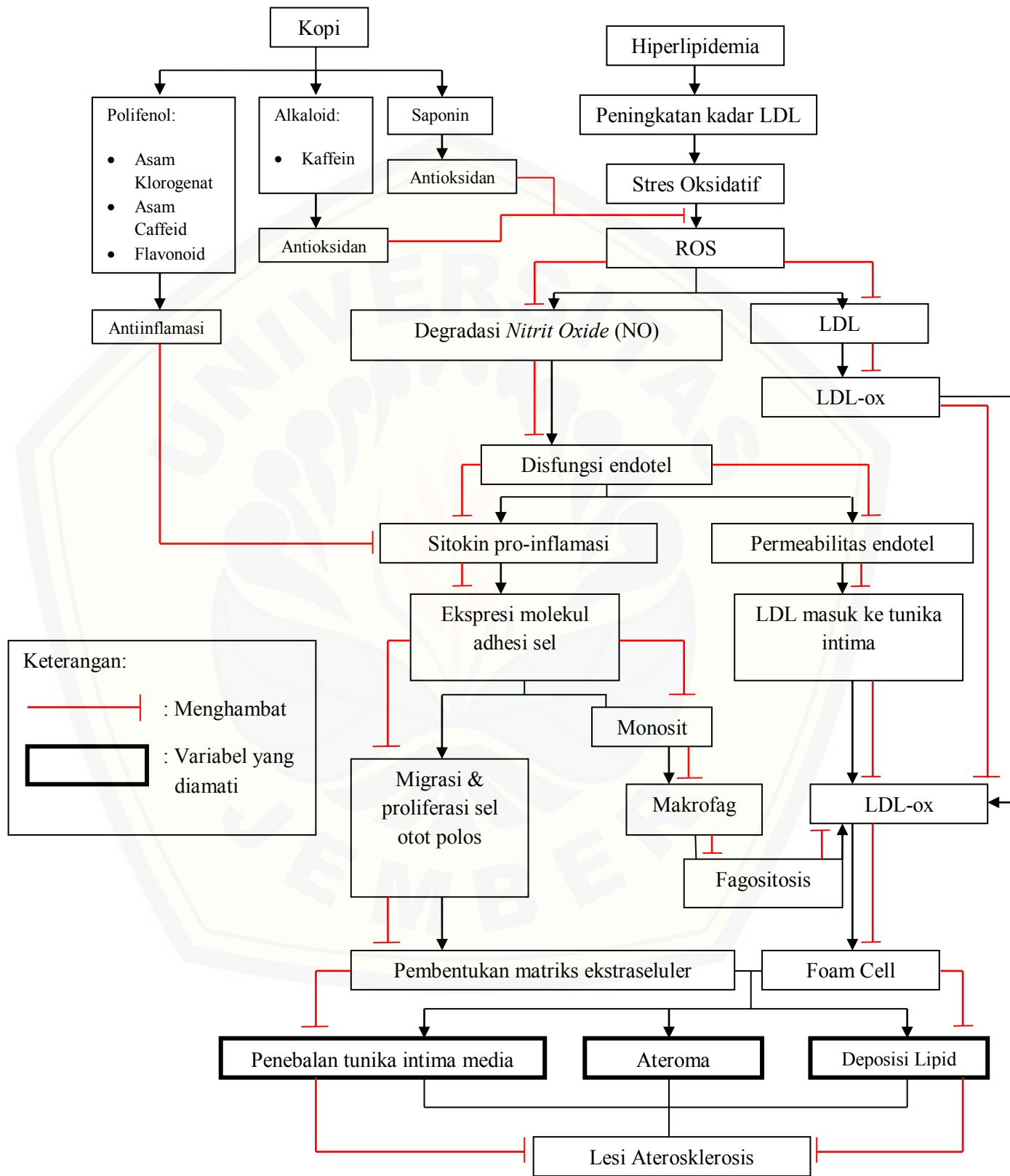
Salah satu senyawa polifenol yaitu asam klorogenat dalam biji kopi robusta (*Coffea canephora*) memiliki efek sebagai antiinflamasi dan antioksidan. Senyawa alkaloid dalam kopi yaitu kafein dan saponin memiliki efek sebagai antioksidan sehingga mampu melindungi tubuh dari efek radikal bebas. Antioksidan sangat penting dalam usaha untuk menghambat reaksi oksidasi yang menghasilkan radikal bebas dan turunannya (Ciptaningsih, 2012).

Kandungan saponin dalam kopi terbukti dapat menghambat pembentukan radikal bebas dengan melepaskan oksigen tunggal sehingga dapat mencegah kerusakan pada sel akibat proses oksidasi (Hall dkk., 2015). Kafein juga merupakan antioksidan kuat yang melindungi terhadap kerusakan sel yang disebabkan oleh radikal bebas dan peroksida. Penelitian sebelumnya telah menunjukkan bahwa kafein dan metabolitnya seperti *theobromine* dan *xanthine*

melindungi terhadap produksi radikal bebas, seperti radikal hidroksil(OH), peroksil radikal (ROO). Kandungan kafein dalam kopi juga terbukti memiliki efek anti-inflamasi. Dari penelitian yang telah dilakukan, kafein dan salah satu metabolit utama, paraxanthine, berperan untuk menghambat produksi *tumor necrosis factor-alpha* (TNF- α) (Hall dkk., 2015).

Asam klorogenat merupakan komponen fenol utama dalam kopi dan kopi merupakan salah satu tanaman yang mengandung asam klorogenat dalam konsentrasi yang tinggi. Jumlah asam klorogenat mencapai 90% dari total fenol yang terdapat pada kopi. Asam klorogenat adalah suatu senyawa yang termasuk kedalam komponen fenolik, mempunyai sifat yang larut dalam air dan terbentuk dari esterifikasi *quinic acid* dan *transcinnamic acid* tertentu seperti asam kafein, asam ferulik, dan *p-coumaric acid*. Dari penelitian yang pernah dilakukan asam klorogenat terbukti mengurangi produksi sejumlah mediator proinflamasi, termasuk TNF- α , interleukin (IL) -1 β , IL-6 dan interferon (IFN) - γ dalam sel makrofag (Shibata dkk., 2010).

2.5 Kerangka Teori



Gambar 2.11 Kerangka konsep

2.6 Hipotesis

Hipotesis pada penelitian ini yaitu pemberian seduhan Kopi Robusta (*Coffea canephora*) dapat menghambat pembentukan lesi aterosklerosis karotis pada tikus wistar (*Rattus norvegicus*) hiperlipidemia.



BAB 3. METODE PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian

Jenis penelitian ini adalah penelitian eksperimental laboratoris *in vivo* (Notoatmodjo, 2005).

3.2 Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian yang digunakan adalah *the post test only control group design* yaitu melakukan pengukuran atau observasi pada kelompok kontrol negatif, kelompok kontrol positif, dan kelompok perlakuan pada waktu yang telah ditentukan (Notoatmodjo, 2005).

3.3 Tempat dan Waktu Penelitian

3.3.1 Tempat Penelitian

Penelitian diawali dengan pemeliharaan dan pemberian perlakuan terhadap hewan coba yang dilakukan di Laboratorium Fisiologi Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember. Pengukuran kadar *Low Density Lipoprotein* (LDL) dilaksanakan di Laboratorium Piramida Jember. Processing jaringan dan pembuatan preparat histologi dilakukan di Laboratorium Histologi Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada. Pewarnaan dan pengamatan preparat dilakukan di Laboratorium Histologi Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.

3.3.2 Waktu Penelitian

Pelaksanaan penelitian dilakukan pada bulan Desember 2017 hingga Januari 2018.

3.4 Identifikasi Variabel Penelitian

3.4.1 Variabel Bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah seduhan kopi kopi robusta (*C. canephora*).

a. Definisi Operasional

Seduhan kopi robusta (*C. canephora*) adalah hasil pelarutan bubuk kopi sediaan kopi bubuk murni Robusta Gunung Ijen (PTP XII Persero, Indonesia) dengan air. Konsumsi seduhan kopi robusta diberikan sebanyak 3,6 ml/hari yang diberikan dua kali sehari.

b. Parameter

Pemberian seduhan kopi robusta disesuaikan dengan konsumsi secangkir kopi setiap hari pada manusia dengan kadar dan dosis pada tikus selama 28 hari.

c. Metode

Pembuatan seduhan kopi robusta dilakukan dengan menambahkan air mendidih (100°C) pada 3 gram bubuk kopi robusta, kemudian diaduk dan disaring. Pemberian dilakukan dengan metode sonde lambung yang diberikan dua kali sehari setiap pagi dan sore.

3.4.2 Variabel Terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah gambaran histomorfometrik lesi aterosklerosis karotis meliputi penebalan dinding arteri, deposisi lipid dan plak ateroma.

a. Penebalan dinding arteri

1.) Definisi Operasional

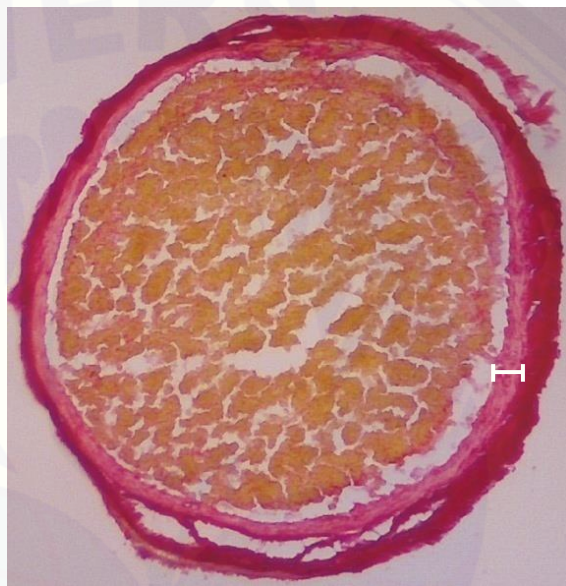
Ukuran ketebalan dinding arteri karotis yang menjorok ke lumen yang diukur dari tunika intima sampai tunika media.

2.) Parameter yang diamati

Ukuran ketebalan dinding arteri karotis dalam satuan mikrometer (μm) yang diukur dari tunika intima sampai tunika media (Gambar 3.1).

3.) Metode pengamatan

Ketebalan dinding arteri karotis diukur dengan mikrometer grade dari tunika intima sampai tunika media, di bawah mikroskop cahaya dengan visualisasi menggunakan optilab pada perbesaran 400x. Pengukuran dilakukan pada 3 lapang pandang yang dianggap paling representatif dan dipilih daerah yang paling tebal. Pengamatan dilakukan oleh 3 orang pengamat, selanjutnya dilakukan penghitungan nilai rerata ketebalan dinding arteri karotis sehingga didapatkan data kuantitatif.



Gambar 3.1 Pengukuran Ketebalan Dinding Arteri Karotis. Anak panah putih menunjukkan ketebalan dinding yang diukur menggunakan *micrometer grade* dari tunika intima hingga media (Intimal Medial Thickness/ IMT)

b. Plak ateroma

1.) Definisi operasional

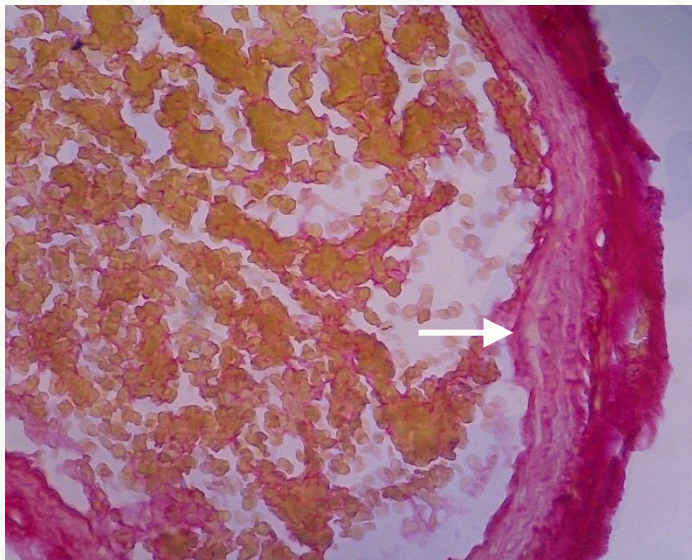
Bentukan menonjol ke sisi dalam (luminal) arteri yang berbentuk irregular sehingga menyebabkan berhimpitnya dua sisi dinding arteri sehingga lumen arteri menyempit.

2.) Parameter yang diamati

Ada/tidaknya bentukan menonjol ke sisi dalam (luminal) arteri yang berbentuk irregular sehingga menyebabkan berhimpitnya dua sisi dinding arteri sehingga lumen arteri menyempit (Gambar 3.2)

3.) Metode pengamatan

Ateroma pada preparat dengan pewarnaan *Picrosirius Red* diamati di bawah mikroskop cahaya, perbesaran 400x dengan visualisasi menggunakan optilab. Pengamatan dilakukan pada tepi dinding dan lumen arteri yang dilakukan oleh 3 orang pengamat. Pada arteri yang diamati, jika ditemui adanya bentukan menonjol ke dalam lumen diberi skor 1, sedangkan jika tidak ditemui adanya bentukan menonjol ke dalam lumen diberi skor 0. Selanjutnya dilakukan penghitungan persentase bentukan menonjol pada sisi dalam lumen pada masing-masing kelompok sehingga didapatkan data kualitatif.



Gambar 3.2 Gambaran Ateroma pada Arteri Karotis Tikus (ditandai panah putih)

c. Deposisi lipid

1.) Definisi operasional

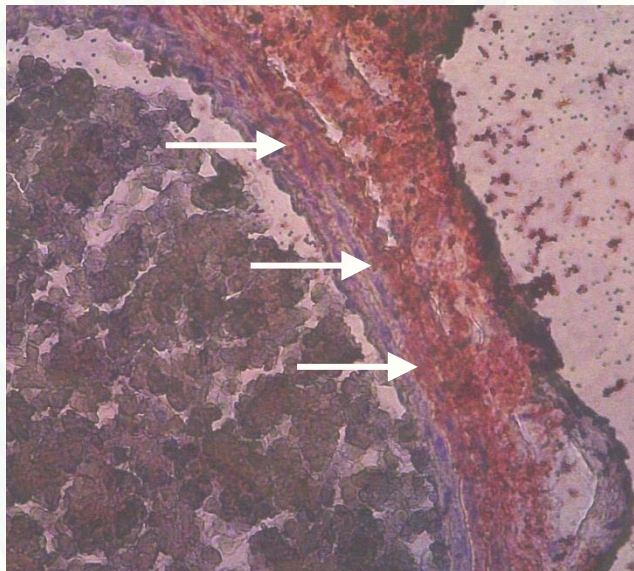
Akumulasi lipid pada lapisan subendotel, permukaan tunika intima dan tunika media yang ditandai dengan adanya bercak atau bintik berwarna merah.

2.) Parameter yang diamati

Ada/tidaknya bercak atau bintik berwarna merah pada lapisan subendotel, permukaan tunika intima, dan tunika media. Warna merah menunjukkan adanya deposisi lipid (Gambar 3.3).

3.) Metode pengamatan

Pengamatan deposisi lipid pada sediaan preparat dengan pewarnaan *Sudan IV* dilakukan di bawah mikroskop cahaya, perbesaran 400x dengan visualisasi menggunakan optilab. Pengamatan dilakukan pada lapisan permukaan tunika intima, tunika media, dan tunika adventitia dan diamati oleh 3 orang pengamat. Pada arteri yang diamati, jika ditemui adanya deposisi lipid diberi skor 1, sedangkan jika tidak ditemui adanya deposisi lipid diberi skor 0. Selanjutnya dilakukan penghitungan persentase deposisi lipid arteri pada masing-masing kelompok sehingga didapatkan data kualitatif.



Gambar 3.3 Gambaran Histomorfologik Deposisi Lipid (ditandai panah putih) pada dinding arteri dengan pengecatan *Sudan IV*

3.4.3 Variabel Terkendali

Variabel terkendali pada penelitian ini sebagai berikut:

- Kriteria sampel meliputi galur tikus, jenis kelamin, berat badan, umur, dan kondisi fisik.
- Prosedur penelitian

3.5 Sampel Penelitian

3.5.1 Besar Sampel Penelitian

Besar sampel penelitian yang digunakan dalam penelitian ini sebanyak 4 ekor tikus setiap kelompok perlakuan. Adapun besar obyek didapat dari perhitungan rumus sebagai berikut (Daniel, 2008).

$$n \geq \frac{Z^2 \times \sigma^2}{d^2}$$

Keterangan :

n : besar obyek tiap kelompok

Z : nilai Z pada tingkat kesalahan tertentu, jika $\alpha = 0,05$ maka $Z = 1,96$

σ : standar deviasi obyek

d : kesalahan yang masih dapat di toleransi

Dengan asumsi bahwa kesalahan yang masih dapat di terima (σ) sama besar dengan (d) maka :

$$n \geq \frac{Z^2 \times \sigma^2}{d^2}$$

$$n \geq 3,84$$

$$n \geq (1,96^2)$$

$$n \geq 4$$

Hasilnya didapatkan jumlah replikasi minimal sebanyak 4 ekor tikus wistar jantan (*Rattus norvegicus*) pada setiap kelompok. Penelitian ini menggunakan 3 kelompok, sehingga jumlah keseluruhan tikus wistar jantan yang digunakan dalam penelitian ini adalah 12.

3.5.2 Kriteria Sampel Penelitian

Sampel penelitian ini adalah tikus wistar jantan (*Rattus norvegicus*) dengan kriteria inklusi sebagai berikut:

- a. tikus wistar jantan putih (*Rattus norvegicus*)
- b. jenis kelamin jantan
- c. berat badan 200 gram
- d. umur 2-3 bulan
- e. kondisi fisik tikus dalam keadaan sehat (warna bulu putih bersih, dan mata tikus merah normal).

Kriteria eksklusi adalah tikus yang mati selama penelitian. Tikus dinyatakan *drop out* jika tikus memiliki kriteria eksklusi dan diganti dengan tikus lain sesuai kriteria inklusi sehingga didapatkan jumlah sampel yang sesuai dengan besar sampel.

3.6 Alat dan Bahan Penelitian

3.6.1 Alat Penelitian

- a. Alat-alat untuk pemeliharaan hewan coba terdiri dari, kandang hewan coba, wadah pakan, wadah minum, timbangan neraca, spidol marker, dan pembersih kandang.
- b. Alat-alat yang digunakan untuk pemeriksaan kadar LDL hewan coba terdiri dari masker, *handscoon*, kasa, *disposable syringe* 5ml, tabung *ependorf*, tabung hematokrit, tabung reaksi, mikropipet, sentrifuge, *vortex*, dan spektrofotometer.,
- c. Alat-alat yang digunakan untuk membuat seduhan kopi terdiri dari *heater*, thermometer, gelas, sendok, dan saringan kopi.
- d. Alat-alat yang digunakan untuk pembuatan dan pemberian pakan tinggi kolesterol terdiri dari timbangan neraca, wadah pakan, sendok, sonde lambung, spuit 3ml, spuit 5ml, masker, dan *handscoon*.
- e. Alat-alat untuk bedah tikus terdiri atas papan *wax*, jarum, pinset anatomis, pinset *chirurgis*, gunting, *scalpel*, masker, sarung tangan dan wadah untuk membersihkan organ.
- f. Alat-alat untuk pembuatan sediaan histologi terdiri atas, mesin *cryostate* (Leica, Jerman), *object glass* (Citoplus, China) dan *cover glass*.

- g. Alat-alat untuk pengecatan jaringan terdiri dari tabung reaksi, pipet, rak pengecatan, timbangan digital (Snug-300, China), dan kertas saring.
- h. Alat-alat untuk pengamatan terdiri atas, mikroskop cahaya (Olympus, Jepang) dan optilab (OptiLab Advance, Indonesia).

3.6.2 Bahan Penelitian

- a. Kopi Robusta Gunung Ijen (PTP XII Persero, Jawa Timur, Indonesia)
- b. Bahan pembuatan pakan kolesterol yang terdiri dari kuning telur bebek dan lemak babi yang telah diencerkan, yang dibuat emulsi dengan cara mencampurkan kedua bahan tersebut kemudian diaduk perlahan.
- c. Pakan standar (Turbo, Indonesia) serta air minum (Aqua, Indonesia).
- d. Bahan untuk proses persiapan pembedahan yaitu ketamin.
- e. Bahan untuk *processing* jaringan terdiri atas formalin 10%, larutan PBS (BioWORLD, USA), sukrose 30%, *tissue tex*, aluminium foil, *poly l-lysin*.
- f. Bahan untuk pengecatan jaringan terdiri atas aquades, larutan *Picrosirius Red* (ScyTek, USA), larutan asam (asam asetat), etanol 100%, *xylane* (Merck, Jerman), *propylane glycol absolute* (Gama Scientific Biolab, Indonesia), *propylane glycol 85%* (Gama Scientific Biolab, Indonesia), larutan *Sudan IV* (Sigma-Aldrich, USA), *Mayer's Hematoxylin* (Merck, Jerman), formalin 10%, *glycerin jelly* (Merck, Jerman), *Canada balsam* (Merck, Jerman).
- g. Minyak imersi (Olympus Corp., Jepang).
- h. Bahan tambahan sterilisasi terdiri atas, kapas steril dan spritus.

3.7 Prosedur Penelitian

3.7.1 Ethical Clearance

Sebelum dilaksanakan penelitian, prosedur perlakuan terhadap hewan coba telah memenuhi syarat kelayakan oleh Komisi Etik Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Gadjah Mada dengan nomor surat 001062/KKEP/FGK_UGM/EC/2017.

3.7.2 Persiapan Hewan Coba

Penelitian ini dilakukan pada hewan coba yang telah sesuai dengan kriteria, diadaptasikan selama 7 hari di dalam kandang dan diberi makan pakan standar normokolesterol dan minum.

3.7.3 Pembagian Kelompok Hewan Coba

Hewan coba dibagi menjadi 3 kelompok secara acak, yaitu:

- a. Kelompok 1 (4 ekor) merupakan kelompok kontrol negative yang diberi makan dengan pakan standar normokolesterol dan air minum secara *ad libitum* selama 28 hari.
- b. Kelompok 2 (4 ekor) merupakan kelompok kontrol positif hiperlipidemia yang diberi makan dengan pakan standar normokolesterol dan air minum secara *ad libitum*, ditambah dengan lemak babi yang telah dicairkan sebanyak 3gr/hari dan kuning telur bebek 2 ml/hari yang diberikan dua kali sehari yaitu setiap pagi dan sore selama 28 hari.
- c. Kelompok 3 (4 ekor) merupakan kelompok perlakuan hiperlipidemia dan kopi yang diberi makan dengan pakan standar normokolesterol dan air minum secara *ad libitum*, ditambah dengan lemak babi yang telah dicairkan sebanyak 3gr/hari dan kuning telur bebek 2 ml/hari, serta ditambahkan pemberian seduhan kopi 3,6 ml/hari yang diberikan dua kali sehari yaitu setiap pagi dan sore selama 28 hari.

3.7.4 Pembuatan dan Pemberian Pakan Tinggi Kolesterol

Pembuatan pakan tinggi kolesterol dilakukan dengan mencampurkan kuning telur bebek yang telah dikocok sebelumnya dengan lemak babi yang telah dicairkan dengan perbandingan 2:3 (kuning telur bebek : lemak babi), keduanya diaduk perlahan menggunakan sendok hingga tercampur rata. Dosis lemak babi sebesar 150 mg/hari untuk manusia, setelah dikonversi untuk tikus putih menjadi $0,018 \times 150 \text{ gram} = 2,7 \text{ gram}/200 \text{ gram BB/hari}$. Jadi pemberian lemak babi pada tikus putih sebesar 3 gram/200 gram BB/ hari. Dosis untuk kuning telur adalah 2

gram/200 gram BB/ tikus. Pakan tinggi kolesterol diberikan menggunakan sonde lambung setiap hari selama 28 hari (Harsa, 2014).

3.7.5 Pembuatan dan Pemberian Seduhan Kopi

Pembuatan seduhan kopi dilakukan dengan melarutkan 3 gr bubuk kopi pada 200 ml air mendidih (100°C) yang kemudian diaduk dan disaring (Susilawati dkk., 2014), kemudian disondasekan ke tikus sebanyak 3,6 ml/hari. Dosis tersebut didapat dari dosis konversi dari manusia ke tikus yaitu $0,018 \times 200 \text{ ml} = 3,6 \text{ ml/hari}$. Pemberian dosis tersebut berdasarkan simulasi kebiasaan meminum satu cangkir kopi (200ml) dalam satu hari. Pemberian seduhan kopi dilakukan dengan mencampurkan seduhan kopi pada pakan yang dilakukan selama 28 hari.

3.7.6 Pemeriksaan kadar *Low Density Lipoprotein* (LDL)

Pemeriksaan kadar *Low Density Lipoprotein* (LDL) dilakukan sebelum dekapitasi hewan coba. Pengambilan darah dilakukan melalui vena infraorbita sebanyak 3 ml yang diletakkan dalam tabung *ependorf* untuk kemudian dilakukan proses sentrifuge dengan kecepatan 5000 rpm hingga didapatkan serum darah. Penghitungan profil lipid dilakukan secara enzimatik menggunakan spektrofotometer. Kadar LDL normal pada tikus yaitu dibawah 37,99 mg/dl (Saadah, 2016).

3.7.7 Pengambilan Jaringan Arteri Karotis

Setelah perlakuan selama 28 hari, pada hari ke-29 semua sampel hewan coba dikorbankan untuk diambil arteri karotis komunis dekat percabangan arteri karotis interna dan arteri karotis eksterna. Eutanasia hewan coba dilakukan dengan injeksi ketamin secara intramuskular, setelah hewan coba tidak sadar, dilakukan pembedahan untuk pengambilan arteri karotis. Jaringan difiksasi dengan formalin 10% yang dicampur dengan larutan PBS dengan perbandingan 1:9. Jaringan yang telah difiksasi, dikemas dalam wadah berlabel yang selanjutnya dikirim ke Lab. Histologi FKG UGM untuk dilakukan pematangan menggunakan teknik potongan beku (*Frozen Section*) dengan ketebalan potongan sebesar 10 μm .

3.7.8 Pemrosesan Jaringan Arteri Karotis

1) Pemotongan Jaringan

Arteri karotis difiksasi pada larutan formalin 10% yang dilarutkan PBS dengan perbandingan 1:9, dilakukan pemotongan jaringan menggunakan metode potongan beku (*Frozen Section*). Dalam metode *Frozen Section* tidak memerlukan proses dehidrasi, *clearing agent* dan pada beberapa kasus tanpa media *embedding* sehingga tidak mengakibatkan pelarutan lemak-lemak dalam jaringan. Oleh sebab itu, digunakan metode *Frozen Section* pada penelitian ini.

Teknis dari prosedur *Frozen Section* ini adalah *cryosection*, dimana menggunakan suatu alat *cryotom* yang merupakan mikrotom pada pesawat pembeku (*cryostat*). Tahapan *Frozen Section* sesuai protokol penggunaan Laboratorium Histologi Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Gadjah Mada adalah sebagai berikut:

- a. Jaringan di-*trimming* setebal $\frac{1}{3}$ koronal jaringan arteri karotis, dimasukkan dalam botol yang berisi sukrose 30% dan disimpan ke dalam kulkas kurang lebih 3 hari.
- b. Jaringan diambil dari kulkas, disaring dengan kertas saring kemudian ditetesi dengan *tissue tex* dan didiamkan.
- c. Selama menunggu persiapan jaringan, disiapkan mikrotom *frozen section* (*Cryotom*) dan mesin *frozen section* (*Cryostat*). Langkah persiapan *cryostat* adalah sebagai berikut:
 - 1) Pastikan kabel terpasang pada arus listrik
 - 2) Tekan *On*
 - 3) Selanjutnya tekan tombol start
 - 4) Mesin otomatis menyesuaikan pada suhu mencapai -25°C
 - 5) Untuk mencapai -25°C membutuhkan waktu 2 jam
- d. Jaringan yang telah siap, di-*embedding* dengan *tissue tex* pada cetakan yang telah diberi *aluminium foil*.
- e. Dimasukkan dalam *frezer* -80°C dan tunggu sampai membeku kurang lebih 10 menit.

- f. Setelah membeku, ambil dan pasang pada *block holder* yang telah ditetesi *tissue tex*, tunggu membeku dan jaringan siap dipotong.
- g. *Block holder* dipasang pada tempatnya kemudian ketebalan potongan diset pada 10 μm .
- h. Setelah didapatkan potongan, potongan ditempelkan pada objek glass yang telah diolesi *poly l-lysin*.
- i. Jaringan diangin-anginkan dan siap diwarnai.
- j. Jika hasil potongan tidak segera diwarnai, disimpan dulu dalam kotak dan ditaruh pada suhu -80°C .

2) Pengecatan

Pengecatan preparat dilakukan di Laboratorium Histologi dan Patologi FKG Universitas Jember. Masing-masing sampel terdiri dari 2 preparat. Preparat tersebut dilakukan pengecatan menggunakan pewarnaan *Picrosirius Red* dan *Sudan IV*.

a. Pengecatan dengan *Picrosirius Red*

Pada proses melihat adanya histomorfologi arteri karotis dan mengukur ketebalan dinding arteri karotis penelitian ini digunakan pengecatan *Picrosirius Red*. Teknik pengecatan yang dilakukan adalah sesuai dengan standar protokol pengecatan *Picrosirius Red*.

Metode pengecatan *Picrosirius Red* sebagai berikut:

1. Preparat direndam dalam aquades selama 15 menit.
2. Preparat diwarnai dengan larutan *Picrosirius Red* pekat selama 60 menit (pastikan jaringan terendam seluruhnya).
3. Preparat dicelupkan sebanyak 2 kali ke dalam 2 larutan asam (asam asetat) yang berbeda.
4. Bilas dengan alkohol absolut dalam wadah.
5. Preparat direndam sebanyak 2 kali ke dalam alkohol absolut yang berbeda selama masing-masing tiga menit.
6. Bersihkan *object glass* di sekitar jaringan dengan *tissue*.
7. *Mounting* menggunakan cairan *canada balsem (entellan)* lalu ditutup dengan *cover glass*.

b. Pengecatan dengan *Sudan IV*

Prosedur pengecatan dengan menggunakan larutan *Sudan IV*, yaitu:

1. Keluarkan preparat jaringan dari lemari es, biarkan dalam suhu ruang selama 30-60 menit.
2. Tetesi preparat jaringan dengan formalin 10%, biarkan selama 5-10 menit, lalu keringkan selama 30-60 menit.
3. Bilas dengan akuades sebanyak 3 kali, keringkan.
4. Tetesi preparat jaringan dengan *propylane glycol* 100%, biarkan selama 2-5 menit lalu keringkan.
5. Lakukan pengecatan *Sudan IV* dengan meneteskan larutan *Sudan IV* secukupnya di atas preparat jaringan dan biarkan selama 8-10 menit dalam suhu 60⁰ C (dalam *autoclave*), setelah itu keluarkan dari *autoclave*.
6. Tetesi preparat jaringan dengan *propylane glycol* 85% selama 1 menit.
7. Bilas dengan akuades sebanyak 2 kali.
8. Lakukan pengecatan *Mayer's Hematoxilin* selama 30 detik.
9. Rendam preparat jaringan dalam wadah yang berisi air mengalir selama 3 menit.
10. Bilas preparat jaringan dengan akuades.
11. *Mounting* menggunakan *glycerin jelly* lalu ditutup dengan *cover glass*.

3.8 Pengamatan

3.8.1 Pengukuran Penebalan Dinding Arteri Karotis (Histomorfometrik)

Pengukuran ketebalan dinding arteri karotis menggunakan *software Image Raster* pada *Optilab* yang telah terkalibrasi dalam mikrometer (μm). Pengukuran dilakukan di bawah mikroskop pada preparat yang telah diwarnai *Picrosirius Red* dengan perbesaran 400x. Ketebalan dinding arteri karotis diukur dari tunika intima hingga tunika media (*Intima-Media Thickness/IMT*) pada daerah yang

paling tebal. Pengamatan dilakukan oleh 3 pengamat pada tiga lapang pandang yang dianggap paling representatif. Dari hasil tersebut dilakukan penghitungan nilai rerata ketebalan dinding arteri karotis sehingga didapatkan data kuantitatif.

3.8.2 Pengamatan Ateroma

Pengamatan gambaran histologi arteri karotis dilakukan menggunakan mikroskop cahaya dengan pewarnaan *Picrosirius Red* perbesaran 400x. Pengamatan dilakukan oleh 3 pengamat pada satu lapang pandang yang dianggap paling representatif. Arteri yang terdapat ateroma terlihat adanya bentukan menonjol ke dalam pada tunika intima sehingga membuat permukaan arteri tidak rata, dan terdapat penebalan pada dinding arteri karotis. Pada arteri yang diamati, jika ditemui adanya ateroma diberi skor 1, sedangkan jika tidak ditemui adanya ateroma diberi skor 0. Dari hasil tersebut dilakukan penghitungan persentase ateroma arteri pada masing-masing kelompok sehingga didapatkan data kualitatif.

3.8.3 Pengamatan Deposisi Lipid

Pengamatan gambaran histologi arteri karotis dilakukan menggunakan mikroskop cahaya, dengan pewarnaan *Sudan IV counterstain Hematoxilin* perbesaran 400x. Pengamatan dilakukan oleh 3 pengamat pada satu lapang pandang yang dianggap paling representatif. Arteri yang terdapat deposisi lipid terlihat adanya bercak atau bintik berwarna merah pada lapisan subendotel, permukaan tunika intima, tunika media, dan tunika adventitia. Jika ditemui adanya deposisi lipid diberi skor 1, sedangkan jika tidak ditemui adanya deposisi lipid diberi skor 0. Dari hasil tersebut dilakukan penghitungan persentase deposisi lipid arteri pada masing-masing kelompok sehingga didapatkan data kualitatif.

3.9 Analisis data

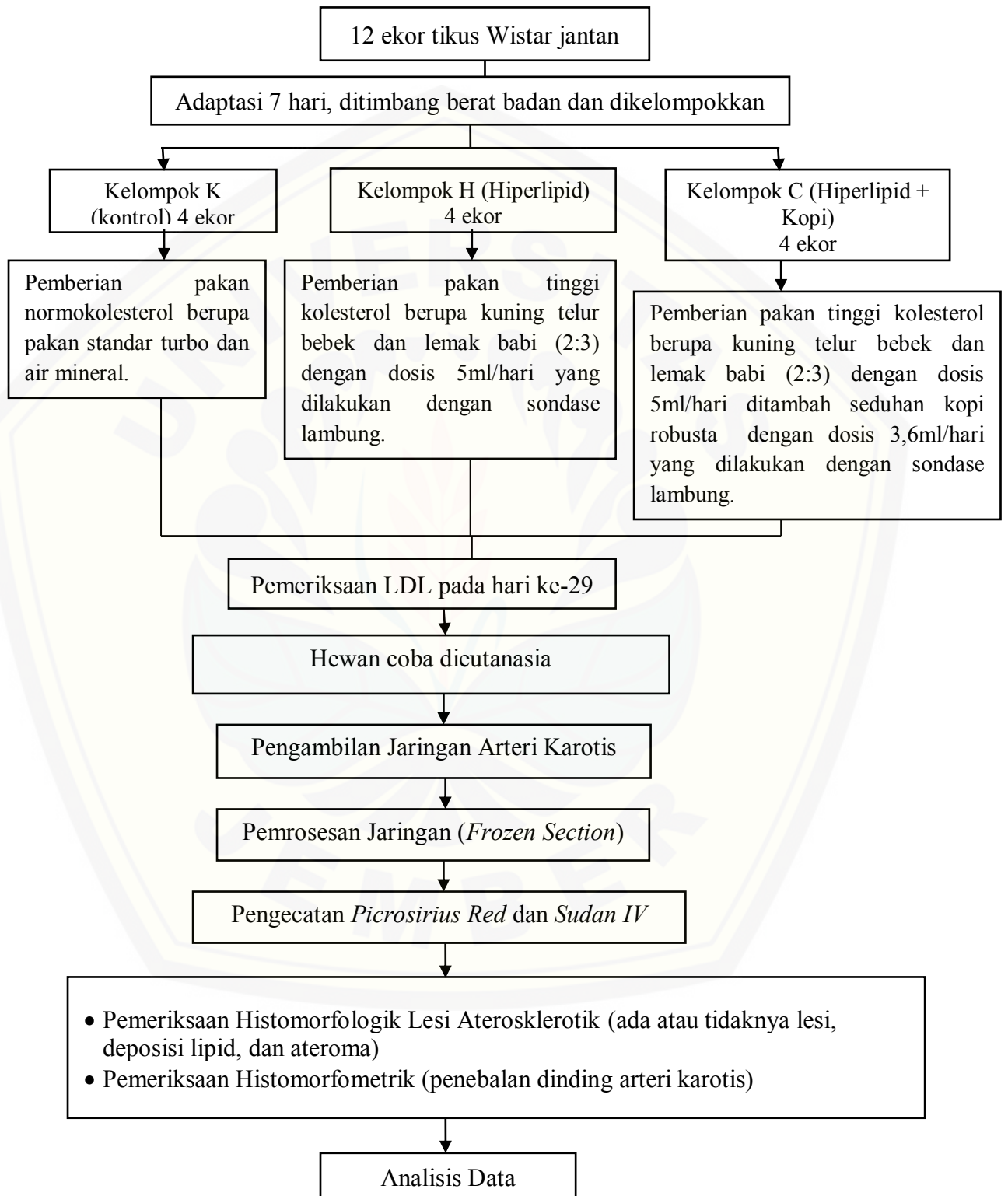
Penelitian ini menghasilkan data kuantitatif berupa hasil pengukuran ketebalan dinding arteri karotis dan data kualitatif (deposisi lipid dan ateroma). Data kuantitatif diuji normalitas dengan uji *Shapiro-Wilk*, kemudian diuji

homogenitas dengan uji *Levene* dan dianalisis dengan uji beda parametrik *Independent One Way ANOVA*.

Data kualitatif (ateroma dan deposisi lipid) didapatkan dengan menganalisis spesimen, apabila ditemui adanya lesi diberi skor 1, sedangkan spesimen yang tidak ditemui adanya lesi diberi skor 0. Adanya morfologi lesi aterosklerosis dihitung dan hasil dinyatakan sebagai persentase terbentuknya lesi arteri karotis.



3.10 Alur Penelitian



Gambar 3.4 Alur Penelitian

BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan, maka dapat ditarik kesimpulan bahwa pemberian seduhan kopi robusta (*Coffea canephora*) dapat menghambat pembentukan lesi aterosklerosis karotis pada tikus wistar (*Rattus norvegicus*) hiperlipidemia.

5.2 Saran

Saran yang dapat diberikan pada penelitian selanjutnya yaitu perlu diteliti lebih lanjut mengenai variasi jenis, dosis, dan durasi pemberian pakan tinggi lemak, tingkat keparahan hiperlipidemia, serta variasi jenis kopi, metode penyeduhan, dosis, dan durasi pemberian seduhan kopi robusta (*Coffea canephora*) untuk mengetahui efek yang ditimbulkan.

DAFTAR PUSTAKA

- Abdullah. 2010. Profil Kesehatan Propinsi Sulawesi Tengah. Palu: Dinas Kesehatan Propinsi Sulawesi Tengah.
- Adam, JM. 2010. *Dislipidemia*. dalam: Sudoyo AW, Setiyohadi B, Alwi I, Simadibrata M, Setiati S, editors. Buku Ajar Ilmu Penyakit Dalam. Jakarta: Interna Publishing, 2010.
- Agus S., dan Yanti R. 2010. *Penyakit Periodontal dan Penyakit Jantung Koroner (Aterosklerosis)*. Skripsi. Bandung: Universitas Padjadjaran.
- Aini, Trianike N. 2016. *Identifikasi Lesi Aterosklerosis Koroner pada Tikus Hyper-Low Density Lipoproteinemia*. Skripsi. Jember: Universitas Jember.
- Akinpelu B., Igbaneghu O., Awotunde A., Iwalewa E., dan Oyedapo O. 2014. Antioxidant and antibacterial activities of saponin fractions of *Erythropheleum suaveolens* (Guill. and Perri.) stem bark extract. *Academic Journals* 9(18):826-833
- Alexander Y., Yakov Y., Jing Yuan W., dan Boris N. 2013. Antioxidant and Antiradical Activity of Coffee. *MDPI journal antioxidants*. 236-237.
- Armansyah M., 2010. *Mempelajari Minuman Formulasi Dari Kombinasi Bubuk Kakao Dengan Jahe Instan*. Makassar: Teknologi pertanian Universitas Hasanuddin.
- Boston University Public Health. 2015. [Diakses pada 13 Agustus 2017]
- Cefalu, W.T. 2006. Cardiovascular Disease in Type 2 Diabetes: From Research to Clinical Practice. <http://www.medscape.org> [Diakses pada 20 Agustus 2017].
- Chapple, Iain L.C, Matthews, dan John B. 2007. The role of reactive oxygen and antioxidant species in periodontal tissue destruction. *J. Compilation. Periodontology* 43:160-232.
- Christy T. dan Heather R. 2013. Polyphenols, Inflammation, and Cardiovascular Disease. *Curr Atherosclerosis Rep.* 4-6.
- Ciptaningsih, Erna. 2012. Uji Aktivitas Antioksidan dan Karakteristik pada Kopi Luwak Arabika dan Pengaruhnya terhadap Tekanan Darah Tikus Normal dan Tikus Hipertensi. Skripsi. Jakarta: Fakultas Farmasi Universitas Indonesia.

- Clarke, R. J. dan Macrae, R. 1987. *Coffe Technology 2*. London and New York: *Elsevier Applied Science*.
- Constantinides, P. 2004. *General Pathobiology*. New Jersey: Appleton and Lange.
- Daniel, W. 2008. *Biostatic a Foundation for Analysis in the Health Science 6th Edition*. Canada: John Wiley and Sons, Inc.
- Daniels, S. R. 2008. *Coronaria Risk Factors in Children*. Dalam Heart disease in infant and adolescent. Editor Moss & Adams. Edisi 7. Philadelphia: Lipincott Williams.
- Dorland, W. A. 2006. *Kamus Kedokteran Dorland*. Edisi 29. Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran. EGC.
- Echeverri, D., Montes, F.R., Cabrera, M., Gal'an, A., dan Prieto, A. 2010. Caffeine's Vascular Mechanism of Action. *International Journal of Vascular Medicine*.
- Farah, A. 2012. *Coffee: Emerging Health Effects and Disease Prevention*. Wiley-Blackwell, Oxford.
- Fauziah dan Dina Fitri. 2010. Pengaruh Konsumsi Madu terhadap Penurunan Risiko Penyakit Aterosklerotik Koroner. Skripsi. Depok: Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia.
- Fathoni M. 2011. *Penyakit Jantung Koroner: Patofisiologi, Disfungsi Endothel, dan Manifestasi Klinis Edisi 1*. Surakarta: UNS Press.
- Frederick JS, dan Ramzi SC. 2007. *Pembuluh darah*. Dalam: Kumar, Cotrans, Robbins Buku Ajar Patologi Edisi 7. Jakarta: EGC. 369-378.
- Goetz C.G. 2007. *Textbook of Clinical Neurology Edisi 3*. Philadelphia : Saunders.
- Grassi, Giovambattista D., dan Claudio F.. 2010. Flavonoids: Antioxidants againts Atherosclerosis. *MDPI nutrients*. 1-14.
- Hall, H.A. dan Bassiouny, H.S. 2012. *Pathophysiology of Carotid Atherosclerosis*. Chicago: Springer-Verlag.
- Hall S, Desbrow B, dan Anoopkumar-Dukie S. 2015. A review of the bioactivity of coffee, caffeine and key coffee constituents on inflammatory responses linked to depression. *Food Research International* 76:626–636.

- Hanafiah dan Kemas Ali. 2008. *Rancangan Percobaan Aplikatif*. Raja Grafindo Persada: Jakarta.
- Hannson, G.K. 2005. Mechanisms of Disease: Inflammation, Atherosclerosis, and Coronary Artery Disease: Review Literature. *New England Journal of Medicine* 352:1685-1695.
- Harini M dan Astirin OP. 2009. Blood Cholesterol of Hypercholesterolemic rat (*Rattus novergicus*) after VCO treatment. *Nusantara Bioscience* 1:53-58.
- Harsa, I Made Subhawa. 2014. Efek Pemberian Diet Tinggi Lemak terhadap Profil Lemak Darah Tikus Putih (*Rattus norvegicus*). *Jurnal "Ilmiah Kedokteran"* 3(1):21-28.
- Herwiyarirasanta., BA, dan Eduardus. 2010. Effect of Black Soybean Extract Supplementation in Low Density Lipoprotein Level of Rats (*Rattus norvegicus*) With High Fat Diet. *Science Article Universitas Airlangga. Surabaya*.
- Jannah, Raudatul. 2013. Pengukuran Kadar Ox-LDL (Low Density Lipoprotein Oxidation) pada penderita Aterosklerosis dengan Uji ELISA. *Jurnal Biotropika* 1(2):62-65.
- Jim, Edmond L. 2013. Metabolisme Lipoprotein. *Jurnal Biomedik (JBM)* 5(3):149-156.
- Kadapi, Muamar. 2015. Aktivitas Antioksidan Kopi Biji Rambutan Non Kafein dengan Variasi Perbandingan Komposisi Beras Hitam yang Berbeda (Publikasi). Program Studi Pendidikan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Muhammadiyah Surakarta.
- Kanti Bhooshan P. dan Syed Ibrahim R. 2009. Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2(5):273-274.
- Kumar A., Opole I. O., J. M. Belmont, dan P. M. Moriarty. 2007. Effect of low-density lipoprotein apheresis on inflammatory and noninflammatory high-density lipoprotein cholesterol. *Am. J. Cardiol.* 100:1416–1418.
- Kumar, V., Abbas, A. K., dan Aster, J. C. 2013. *Robbins Basic Pathology* 9th Ed. Canada: Elsevier.
- Kustantini dan Diana. 2014. Beberapa Hal Yang Mempengaruhi Viabilitas Benih (Biji) Kopi (*Coffea Sp*). *Surabaya: Balai Besar Perbenihan dan*

Proteksi Tanaman Perkebunan. Laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran Unair.

Ladich dan Elena R. 2015. *Atherosclerosis Pathology*. Anatomic Cardiovascular Pathology: CV Path Institute, Inc.

Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI). 2009. *Pangan dan Kesehatan*. Jakarta: UPT Balai Informasi Teknologi LIPI.

Liang, N. dan Kitts, D.D. 2015. Role of Chlorogenic Acids in Controlling Oxidative and Inflammatory Stress Conditions. *Nutrients journal*.

Libby P, Dicarli M, dan Weissleder. 2010. The Vascular Biology of Atherosclerosis and Imaging Targets. *Journal of Nuclear Medicine* 51:33-37.

Maslachah L., Sugihartuti R., dan Kurniasanti R. 2008. Hambatan Produksi Reactive Oxygen Species Radikal Superoksida oleh Antioksidan Vitamin E pada Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) yang menerima Stressor Renjatan Listrik. *Media Kedokteran Hewan* 24(1):21-26.

Muttaqin, Arif. 2008. *Buku Ajar Asuhan Keperawatan dengan Gangguan Sistem Persarafan*. Jakarta: Salemba Medika.

Nadie F. dan Rendra C.P. 2018. Efek Seduhan Kopi Robusta terhadap Profil Lipid Darah dan Berat Badan Tikus yang Diinduksi Diet Tinggi Lemak. *Jurnal Kedokteran Brawijaya* 30(1):7-11

Notoatmodjo, S. 2005. *Metodologi Penelitian Kesehatan*. Cetakan Ketiga. Jakarta: Rineka Pustaka.

Peter, Libby. 2012. *The Pathogenesis Of Atherosclerosis*. Harisson Internal Medicine: 18th Edition. McGraw Hill. Chapter 241.

Prajitiasari E.D., 2013. Analisis Critical Value Factors Industri Kopi Biji Rakyat Di Kabupaten Jember. Jember: Fakultas Ekonomi Manajemen Universitas Jember.

Price, S.A. dan Wilson, L.M. 2003. *Patofisiologi: Konsep Klinis Proses-Proses Penyakit Edisi 6*. Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran EGC.

Rahardjo, Pudji. 2012. *Panduan Budidaya dan Pengolahan Kopi Arabika dan Robusta*. Jakarta: Penebar Swadaya.

- Richelle, M., I. Tavazzi, dan E. Offord. 2001. Comparison of the Antioxidant of Commonly Consumed Polyphenolic Beverages (Coffee, Cocoa, and Tea) Prepared per Cup Serving. *J. Agric. Food Chem* 49:3438-3442.
- Ross, R. 2004. *Atherosclerosis and Inflammatory Disease*. New England: Med.
- Saadah N., Purwani K., Nurhayati A., dan Ashuri N. 2016. Analysis of Lipid Profile and Atherogenic Index in Hyperlipidemic Rat (*Rattus norvegicus* Berkenhout, 1769) that Given The Methanolic Extract of Parijoto (*Medinilla speciosa*). *Proceeding of International Biology Conference 1-6*.
- Setia, B. 2014. Kadar Resistin Yang Tinggi Merupakan Risiko Kejadian Kardiovaskular Pada Penderita Sindroma Koroner Akut. Tidak Diterbitkan. Skripsi. Denpasar: Program Studi Ilmu Biomedik Program Pascasarjana Universitas Udayana.
- Shibata, H., Y. Sakamoto, M. Oka, dan Y. Kono. 2010. Natural Antioxidant, Chlorogenic Acid, Protects Against DNA Breakage Caused by Monochloramine. *Departement of Life Science and Biotechnology. Faculty of Life and Environmental Science. Shimane University Japan* 30-32.
- Soebroto, L. 2010. Hubungan antara Kadar LDL Kolesterol pada Penderita Stroke di Rumah Sakit Dr. Moewardi Surakarta. Universitas Sebelas Maret.
- Solange, I., Mussatto, Ercilia, M.S., Machado, Martins, S., Jose, A., dan Teixeira. 2011. Production, Composition, and Application of Coffee and Its Industrial Residues. *Food Bioprocess Technol* 4:661-672.
- Sukohar, A., Setiawan, FF., Wirakusumah, Herry, SS., 2011, Isolasi Dan Karakterisasi Senyawa Sitotoksik Kafein Dan Asam Klorogenat Dari Biji Kopi Robusta Lampung. *Jurnal Medika Planta* 1(4)
- Suryohudoyo, P. 2010. *Kapita Selekta Ilmu Kedokteran Molekuler*. Jakarta : CV Sagung Seto.
- Susilawati, Suryono, dan Ermawati. 2014. Protective Effect of Coffee Against Coronary Atherosclerosis in Periodontitis Model. *Jember: Biomedic Departement Dentistry Faculty University of Jember*.
- Suyatna, F.D. 2007. *Hipolipidemik*. Dalam S.G Gunawan, R. Setiabudy, Nafrialdi, dan Elysabeth Edisi 5. Farmakologi dan Terapi. Jakarta: Departemen Farmakologi dan Terapeutik Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia 374-379.

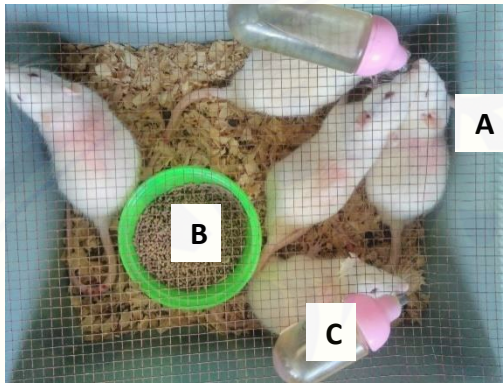
- Syakir, M., 2010. *Budi Daya dan Pasca Panen Kopi*. Bogor: IAARD Press.
- Tomkin, Gerald H. 2012. LDL as a cause of Atherosclerosis. *The Open Atherosclerosis & Thrombosis Journal* 4:13-21.
- Umeno A., Masanori H., Kazutoshi M., Yoshihiro N. dan Yasuzaku Y. 2016. Antioxidative and Antidiabetic Effects of Natural Polyphenols and Isoflavones. *MDPI Molecules* 7-15.
- Varh liou G dan Storz P. 2010. Reactive Oxygen Species in Cancer. *Free Radical Research* 44(5):479-496.
- Waller BF. 2011. Non atherosclerotic coronary heart disease. Dalam: Fuster V, Wane Alexander A, O'Rourke RA Editor Hurst's the heart Edisi 11. New York: McGraw-Hill.
- Wang, Julie C, Bennett, dan Martin. 2012. *Aging and Atherosclerosis: Mechanisms, Functional Consequences, and Potential Therapeutics for Cellular Senescence*. American Heart Association.
- Widyotomo, S. dan Sri, M. 2007. Kafein: Senyawa Penting Pada Biji Kopi. *Warta Pusat Penelitian Kopi dan Kakao Indonesia* 23(1):44-50.
- Winarsi, H. 2007. *Antioksidan Alami dan Radikal Bebas Potensi dan Aplikasinya Dalam Kesehatan*. Yogyakarta: Kaninus.
- World Oral Health Organization (WHO). 2013. Cardiovascular disease (CVDs). <http://www.who.it/mediacentre/factsheets/fs317/en> [Diakses pada 17 Mei 2017]
- Yahmadi, M. 2007. *Rangkaian Perkembangan dan Permasalahan Budidaya & Pengolahan Kopi di Indonesia*. Surabaya: AEKI.
- Yang Woo Seok, Deok Jeong, dan Yi Young-Su. 2013. IRAK1/4-Targeted Ainti-Inflammatory Action of Caffeic Acid. *Hidahwi Publishing Corporation. Mediators of Inflammation* 1-3.
- Yuwono, dan Hendro Sudjono. 2012. Penggunaan Serbuk Kopi Robusta untuk Mengobati Luka. Skripsi. Bandung: Fakultas Kedokteran Universitas Padjajaran.

LAMPIRAN

Lampiran A. Alat dan Bahan Penelitian

A.1 Alat Penelitian

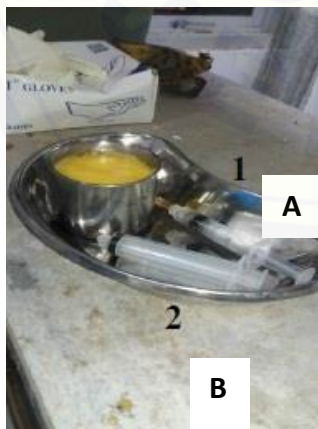
1. Alat Pemeliharaan Hewan Coba



Keterangan :

- A. Kandang
- B. Tempat Makan
- C. Tempat Minum
- D. Timbangan Digital

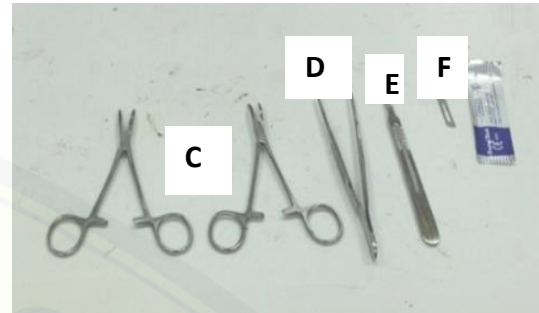
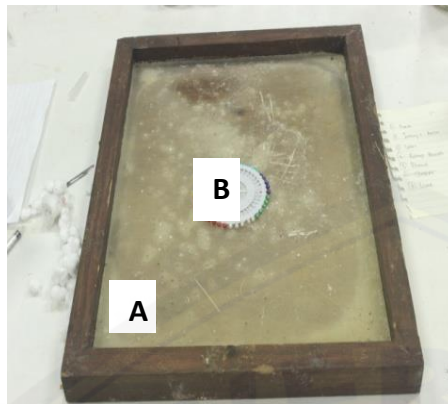
2. Alat Pemberian Pakan Hiperlipid



Keterangan :

- A. Sonde Lambung
- B. Syringe 10 ml

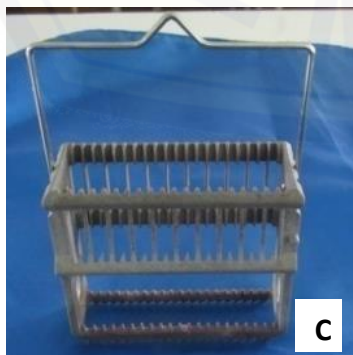
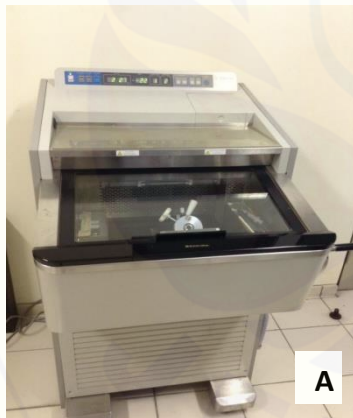
3. Alat Pembedahan Hewan Coba



Keterangan :

- | | |
|------------------|-------------------|
| A. Papan Fiksasi | D. Pinset Anatomi |
| B. Jarum Pentul | E. Scalpel |
| C. Gunting Bedah | F. Blade Scalpel |

4. Alat Pemrosesan Jaringan dan Pengecatan



Keterangan :

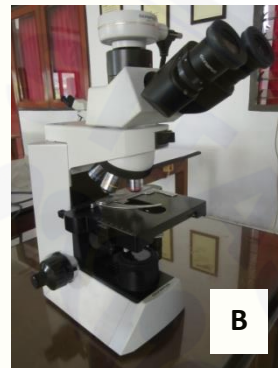
A. Mesin *Frozen section*

B. *Freezer*

C. *Histological Basket*

D. Rak Pengecatan

5. Alat untuk Pengamatan

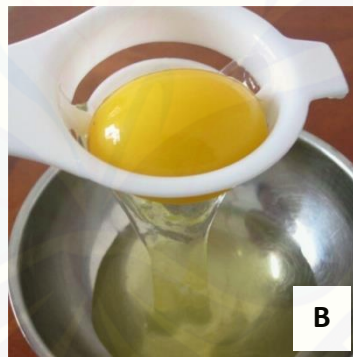


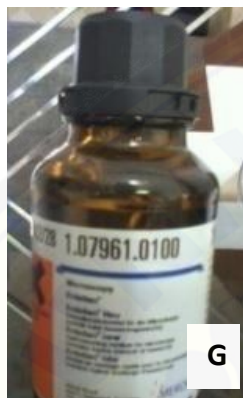
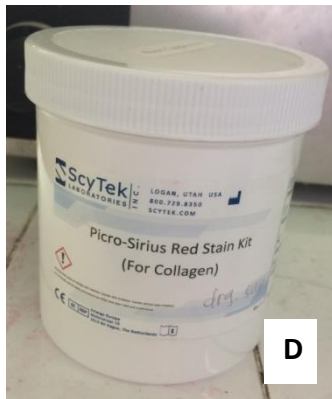
Keterangan :

A. Optilab

B. Mikroskop
Cahaya

A.2 Bahan Penelitian





Keterangan :

- A. Lemak Babi
- B. Kuning Telur Bebek
- C. Kopi Robusta “Gunung Ijen” PTP XII Persero
- D. Bahan Pengecatan *Picrosirius Red*

- E. Bahan Pengecatan *Sudan IV* (1. *Oil Red O*, 2. *Propylene Glycol*)
- F. Larutan PBS
- G. Entellan
- H. *Glycerin*

Lampiran B. Prosedur Penelitian

B.1 Adaptasi Hewan Coba



B.2 Proses Pembuatan Pakan Tinggi Kolesterol dan Seduhan Kopi



Keterangan:

A. Pemuatan Pakan Tinggi Kolesterol

B. Pembuatan Seduhan Kopi

B.3 Proses Pembedahan Hewan Coba

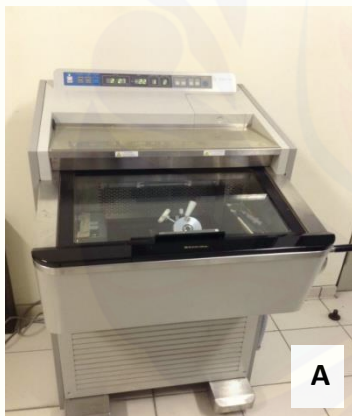


A. Anastesi injeksi ketamin



B. Pembedahan hewan coba untuk pengambilan leher

B.4 Proses *Frozen Section*



A. Alat untuk memotong jaringan dengan suhu dalam alat -20°C



B. Pemotongan jaringan dengan mesin *frozen section*

B.5 Proses Pengecatan Jaringan

A. Persiapan pengecatan spesimen dengan *Picrosirius Red*B. Pembuatan larutan *Sudan IV*C. Proses pengecatan spesimen dengan *Picrosirius Red*D. Proses pengecatan spesimen dengan *Sudan IV*

Lampiran C. Data Hasil Penelitian**C.1 Hasil Pengamatan Histometrik Lesi Aterosklerosis****a. Hasil Pengukuran Ketebalan Dinding Arteri Karotis (μm)**

Kelompok		Pengamat 1			Pengamat 2			Pengamat 3			Rata-rata	SD
		1	2	3	1	2	3	1	2	3		
Kontrol	1	18,86	28,94	24,21	13,67	22,34	26,89	15,73	22,7	26,77	22,23	5,22
	2	13,45	16,95	16,14	15,21	17,14	16,29	13,82	16,5	14,63	15,57	1,35
	3	14,12	14,77	17,1	13,7	14,34	14,89	12,76	14,06	17,97	14,86	1,65
	4	12,9	18,27	20,05	14,56	16,62	18,83	15,22	18,7	19,07	17,14	2,43
Hiperlipid	1	37,75	41,13	50,68	33,98	38,31	42,79	30,61	34,15	48,43	39,76	6,71
	2	33,39	46,63	54,15	32,81	41,29	49,74	32,37	38,78	63,85	43,67	10,86
	3	22,88	47,98	28,39	22,72	46,26	28,85	22,19	44,27	27,9	32,38	10,68
	4	27,39	34,08	33,4	28,38	31,8	27,32	26,77	34,47	33,9	30,83	3,31
Hiperlipid + Kopi	1	12,82	15,38	25,43	12,47	16,57	25,39	14,12	15,48	26,72	18,26	5,84
	2	15,92	12,71	20,05	17,3	16,75	19,81	16,83	16,62	21,15	17,46	2,56
	3	25,47	23,8	26,23	21,25	22,37	25,57	23,32	20,51	25,02	23,73	2,03
	4	29,01	19,04	27,5	24,5	18,89	23,89	23,53	21,19	24,83	23,60	3,46

C.2 Hasil Pengamatan Histomorfologik Lesi Aterosklerosis

a. Hasil Pengamatan Ateroma

Kelompok		Pengamat 1			Pengamat 2			Pengamat 3			Hasil
		1	2	3	1	2	3	1	2	3	
Kontrol	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0
	2	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
	3	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
	4	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0
Persentase											0%
Hiperlipid	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1
	2	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1
	3	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0
	4	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1
Persentase											75%
Hiperlipid + Kopi	1	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0
	2	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0
	3	1	0	0	1	1	0	0	1	0	0
	4	0	1	1	0	1	1	1	0	1	1
Persentase											25%

b. Hasil Pengamatan Deposisi Lipid

Kelompok		Pengamat 1			Pengamat 2			Pengamat 3			Hasil
		1	2	3	1	2	3	1	2	3	
Kontrol	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0
	2	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
	3	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0
	4	1	0	1	0	1	0	0	0	1	0
Persentase											0%
Hiperlipid	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1
	2	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1
	3	1	0	0	0	0	1	1	0	1	0
	4	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1
Persentase											75%
Hiperlipid + Kopi	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0
	2	0	0	1	0	1	1	0	1	0	0
	3	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1
	4	0	1	0	1	1	0	1	0	0	0
Persentase											25%

C.3 Hasil Pemeriksaan Kadar LDL pada Tikus Wistar Hari ke-29 (Nadie dan Rendra, 2018)

Kelompok		Nilai LDL
Kontrol	1	27,8
	2	36,6
	3	32,2
	4	30
Rerata		32,52
Hiperlipid	1	39,4
	2	42,2
	3	40,4
	4	39,6
Rerata		40,4
Kopi	1	32,5
	2	37,6
	3	30,2
	4	29,8
Rerata		31,65

Lampiran D. Hasil Uji Statistik

D.1 Hasil Uji Statistik Parameter Histometrik (Ketebalan Dinding Arteri Karotis)

a. Uji Normalitas (Shapiro-Wilk Test)

	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
ketebalan	,217	12	,123	,884	12	,100

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		Ketebalan
N		12
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	24.9575
	Std. Deviation	9.63850
Most Extreme Differences	Absolute	.217
	Positive	.217
	Negative	-.147
Test Statistic		.217
Asymp. Sig. (2-tailed)		.123 ^c

- a. Test distribution is Normal.
- b. Calculated from data.
- c. Lilliefors Significance Correction.

b. Uji Homogenitas (Levene's Test)

Test of Homogeneity of Variances

Ketebalan

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
3.689	2	9	.068

c. Uji *One Way ANOVA***Descriptives**

Ketebalan

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean	
					Lower Bound	Upper Bound
Kontrol	4	17.4500	3.32601	1.66300	12.1576	22.7424
Hiperlipid	4	36.6600	6.08434	3.04217	26.9785	46.3415
Kopi	4	20.7625	3.36781	1.68391	15.4036	26.1214
Total	12	24.9575	9.63850	2.78239	18.8335	31.0815

ANOVA

Ketebalan

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	843.636	2	421.818	21.295	.000
Within Groups	178.271	9	19.808		
Total	1021.907	11			

d. *Post-hoc Test***Multiple Comparisons**

Dependent Variable: ketebalan

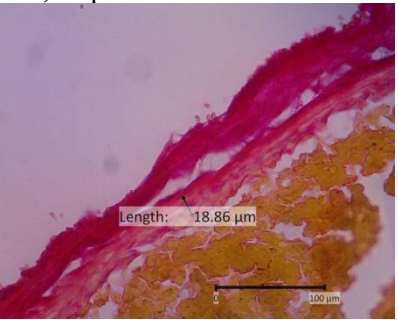
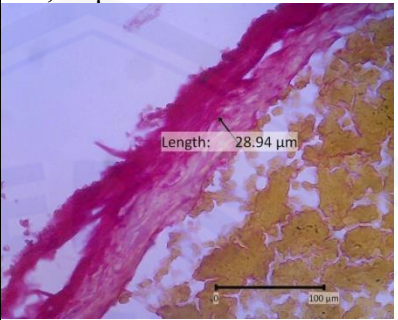
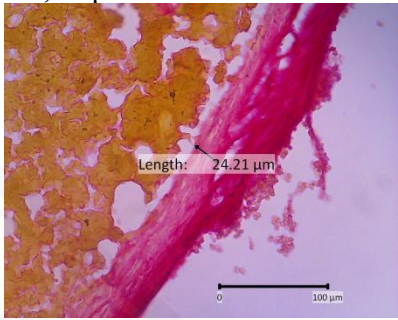
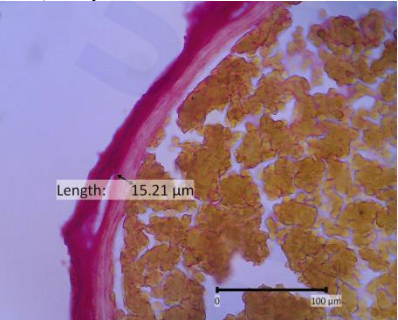
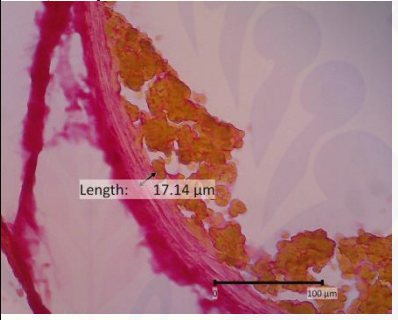
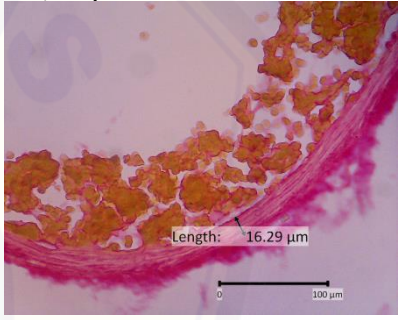
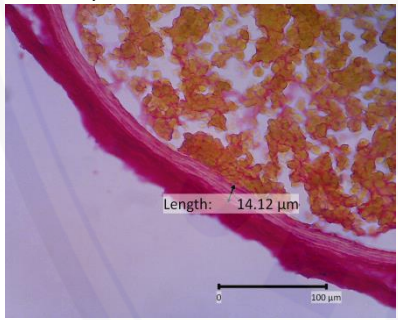

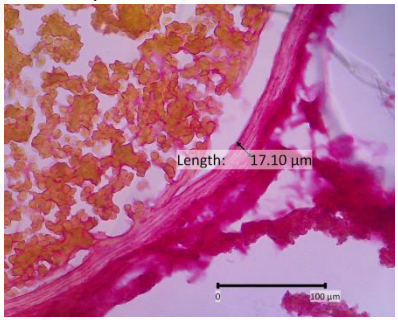
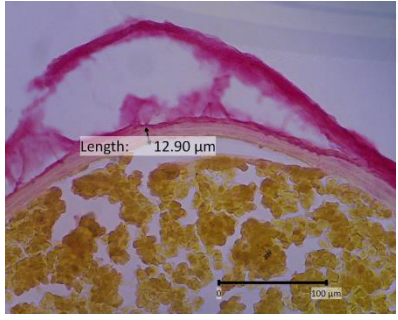
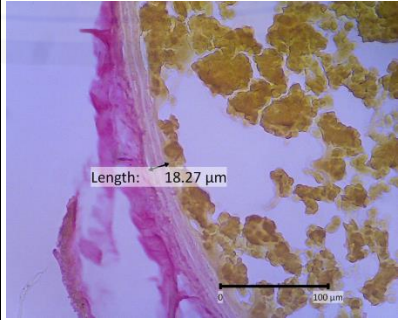
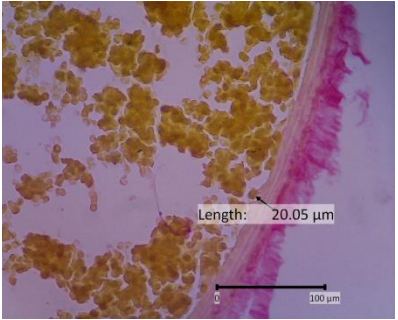
LSD

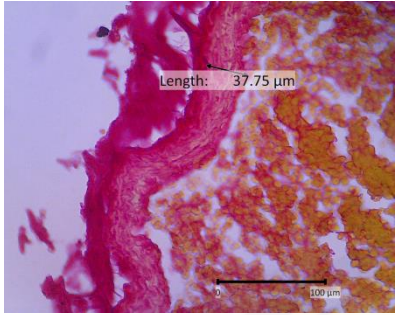
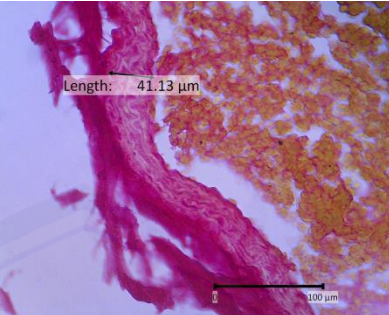

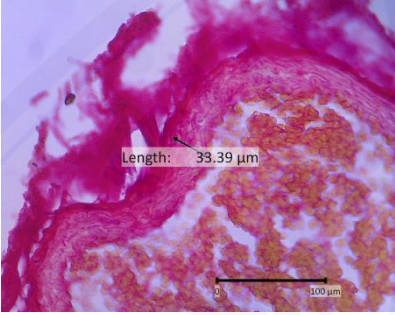
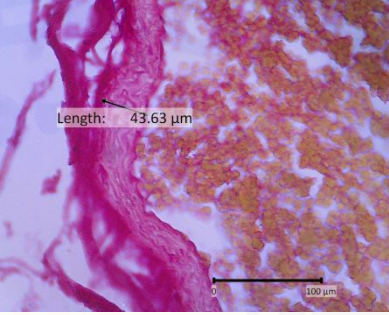
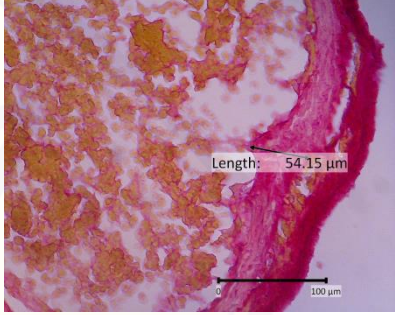
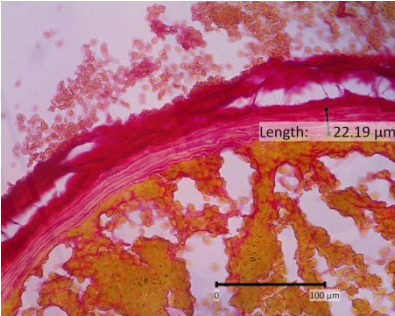


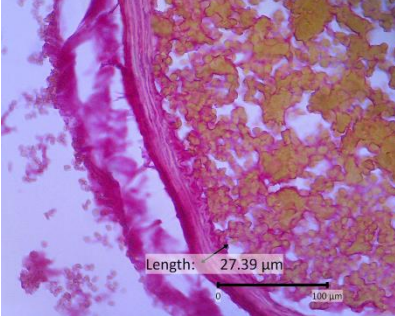

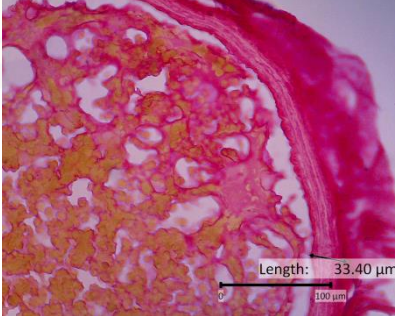
(I) kelompok	(J) kelompok	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
kontrol	hiperlipid	-19,21000*	3,14705	,000	-26,3291	-12,0909
	kopi	-3,31250	3,14705	,320	-10,4316	3,8066
hiperlipid	kontrol	19,21000*	3,14705	,000	12,0909	26,3291
	kopi	15,89750*	3,14705	,001	8,7784	23,0166
kopi	kontrol	3,31250	3,14705	,320	-3,8066	10,4316
	hiperlipid	-15,89750*	3,14705	,001	-23,0166	-8,7784

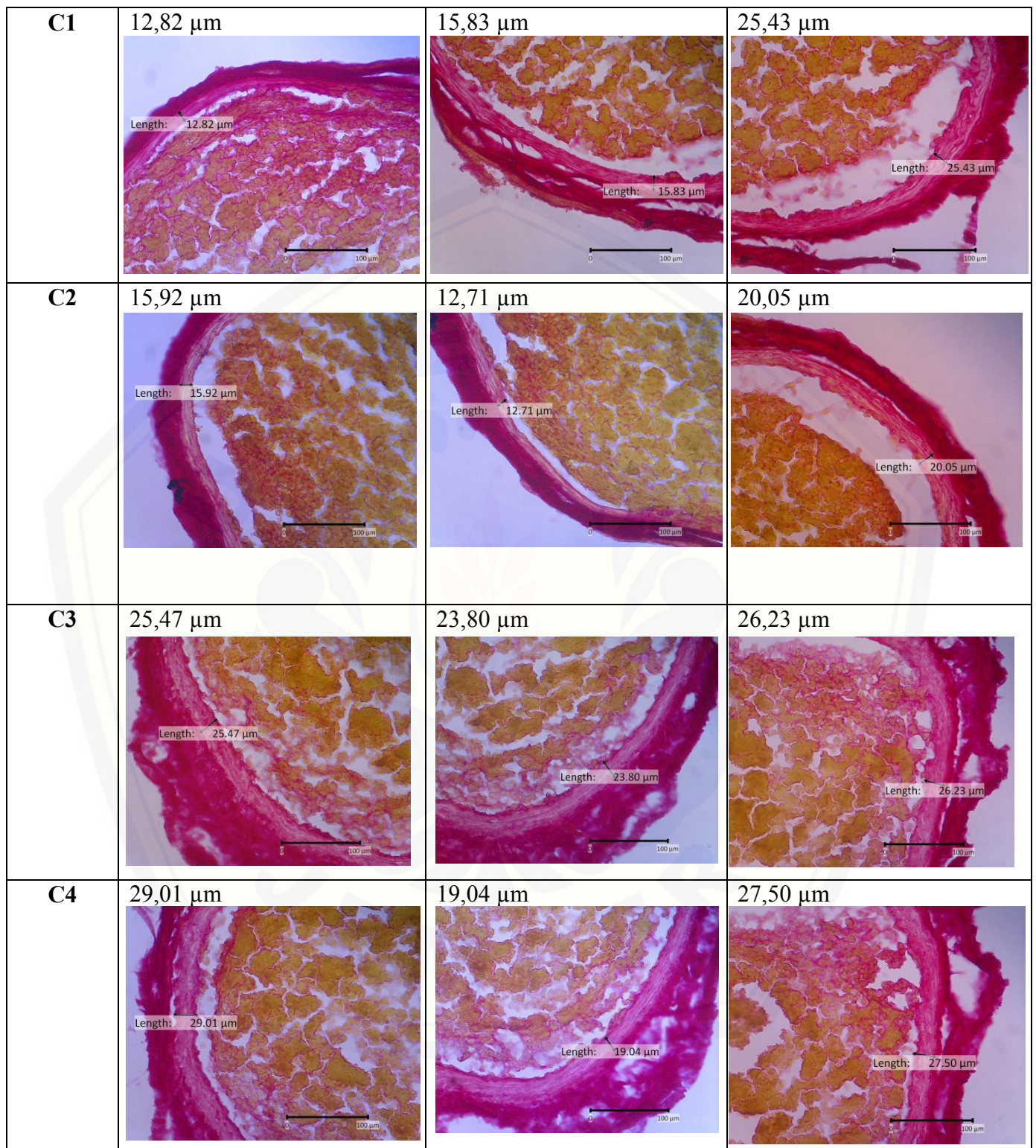
*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

Lampiran E. Gambaran Histologi Lesi Aterosklerosis Karotis

E.1 Ketebalan Dinding Arteri Karotis

	LAPANG PANDANG 1	LAPANG PANDANG 2	LAPANG PANDANG 3
K1	18,86 μm 	28,94 μm 	24,21 μm 
K2	15,21 μm 	17,14 μm 	16,29 μm 
K3	14,12 μm 	14,77 μm 	17,10 μm 
K4	12,90 μm 	18,27 μm 	20,05 μm 

<p>H1</p>	<p>37,75 μm</p> 	<p>41,13 μm</p> 	<p>50,68 μm</p> 
<p>H2</p>	<p>33,39 μm</p> 	<p>43,63 μm</p> 	<p>54,15 μm</p> 
<p>H3</p>	<p>22,19 μm</p> 	<p>44,27 μm</p> 	<p>27,90 μm</p> 
<p>H4</p>	<p>27,39 μm</p> 	<p>34,08 μm</p> 	<p>33,40 μm</p> 

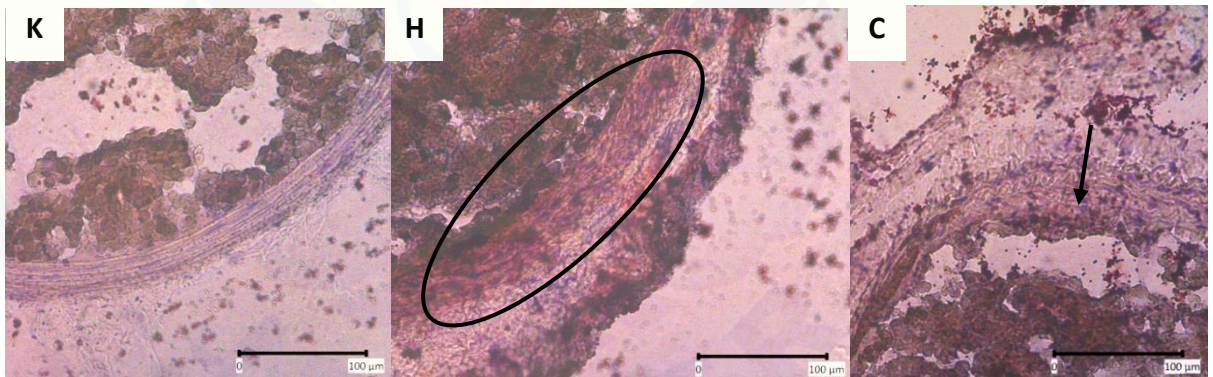


Gambar 1.1 Ketebalan dinding arteri karotis tikus. Ketebalan dinding arteri karotis, pengecatan *Picosirius Red* (perbesaran 400X).

E.2 Gambaran Histomorfologik Lesi Aterosklerosis Karotis


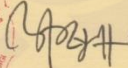
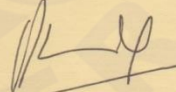
a. Pengecatan *Picrosirius Red*

Gambar 2.1 Ateroma (tanda panah hitam) dan pada arteri karotis tikus, pengecatan *Picrosirius Red* (pembesaran 400x). Kelompok K (kontrol), dinding arteri karotis tidak terdapat ateroma. Kelompok H (diberi pakan tinggi kolesterol) tampak adanya ateroma yang ditandai dengan bentukan menonjol ke arah lumen (tanda panah hitam) dan kelompok C (diberi pakan tinggi kolesterol dan seduhan kopi robusta) tampak adanya ateroma (tanda panah hitam) namun tidak sebanyak pada kelompok hiperlipid (H).

b. Pengecatan *Sudan IV*

Gambar 2.2 Deposisi lipid pada arteri karotis tikus, dengan pengecatan *Sudan IV* (perbesaran 400x). Pada kelompok kontrol (K), tidak tampak adanya deposisi lipid serta dinding arteri terlihat rata. Pada kelompok H (diberi pakan tinggi kolesterol) tampak adanya deposisi lipid yang ditandai warna merah pada lapisan subendotel (tanda lingkaran hitam). Pada kelompok hiperlipid kopi C (diberi pakan tinggi kolesterol dan seduhan kopi robusta) tampak adanya deposisi lipid pada lapisan sub endotel (tanda panah hitam) namun tidak sebanyak pada kelompok hiperlipid.

Lampiran F. Surat Keterangan *Ethical Clearance* Penelitian

 <p>KOMISI ETIKA PENELITIAN FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI UNIVERSITAS GADJAH MADA Sekretariat: Fakultas Kedokteran Gigi UGM Jl. Denta Sekip Utara Yogyakarta Telp. 081239447900</p>	
<p>KETERANGAN KELAIKAN ETIK PENELITIAN ("ETHICAL CLEARANCE") No.001062/KKEP/FKG-UGM/EC/2017</p>	
<p>Setelah Tim Etik Penelitian Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Gadjah Mada mempelajari dengan seksama rancangan penelitian yang diusulkan:</p>	
Judul	: KAJIAN EFEK KOPI PADA INHIBISI ATEROSKLEROSIS KAROTIS
Peneliti Utama	: drg. Rendra Chriestedy Prasetya, M.DSc
Anggota Penelitian	: drg. Nadie Fatimatuzzahro, M.DSc
Penanggung Jawab Medis	: drg. Rendra Chriestedy Prasetya, M.DSc
Unit/Lembaga	: Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember
Lokasi Penelitian	: 1. Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember 2. Laboratorium Biomolekuler Universitas Jember
Waktu Penelitian	: Mei 2017 – Selesai
<p>Maka dengan ini menyatakan bahwa penelitian tersebut telah memenuhi syarat atau laik etik.</p>	
<p>Wakil Dekan Bidang Penelitian, Pengabdian Kepada Masyarakat dan Kerjasama</p>  <p>drg. Trianna Wahyu Utami, M.DSc., Ph.D.</p>	<p style="text-align: right;">Yogyakarta, 4 Mei 2017</p> <p>Ketua Komisi Etik Penelitian FKG UGM</p>  <p>Prof. Dr.drg. Pinandi Sri Pudyani, SU., Sp.Ort(K)</p>

Lampiran G. Surat Ijin Penelitian



KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI, DAN PENDIDIKAN TINGGI
UNIVERSITAS JEMBER
FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI
Jl. Kalimantan No. 37 Jember ☎(0331) 333536, Fak. 331991


Nomor : 4386 /UN25.8.TL/2017
Perihal : Ijin Penelitian

Kepada Yth
Direktur RSGM Universitas Jember
Di
Jember

Dalam rangka pengumpulan data penelitian guna penyusunan skripsi maka, dengan hormat kami mohon bantuan dan kesediaannya untuk memberikan ijin penelitian bagi mahasiswa kami dibawah ini :

- | | | |
|----|-------------------------|---|
| 1 | Nama | : Fadinda Aisa Wiranadiany |
| 2 | NIM | : 141610101045 |
| 3 | Semester/Tahun | : 2017/2018 |
| 4 | Fakultas | : Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember |
| 5 | Alamat | : Jl. Mastrib 1 No.61 Jember |
| 6 | Judul Penelitian | : Efek Pemberian Sedukan Kopi Robusta (Coffea Canephora) Terhadap Pembentukan Lesi Aterosklerosis Karotis Pada Tikus Wistar (Rattus Norvegicus) Hiperlipidemia |
| 7 | Lokasi Penelitian | : Laboraturium Bioscience RSGM Universitas Jember |
| 8 | Data/Alat yang Dipinjam | : - |
| 9 | Waktu | : November 2017 s/d Selesai |
| 1 | Tujuan Penelitian | : Untuk Mengetahui Efek Pemberian Seduhan Kopi Robusta (coffea Cane phora) Terhadap Pembentukan Lesi Aterosklerosis Karotis Pada Tikus Wistar (Rattus Norvegicus) Hiperlipidemia. |
| 11 | Dosen Pembimbing | : 1. drg. Rendra Chiestedy P , MDSc
2. drg. Nadie Fatimatuzzahro , MDSc |

Demikian atas perkenan dan kerja sama yang baik disampaikan terimakasih

an-Dekan
Wakil Dekan I,

Dr. drg. IDA Susilawati, M.Kes
NIP.196109031986022001



KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI, DAN PENDIDIKAN TINGGI
UNIVERSITAS JEMBER

FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI
Jl. Kalimantan No. 37 Jember ☎(0331) 333536, Fak. 331991

Nomor : 4385/UN25.8.TL/2017
Perihal : Ijin Penelitian

Kepada Yth
Kepala Bagian Laboratorium Biomedik
Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember
Di
Jember

Dalam rangka pengumpulan data penelitian guna penyusunan skripsi maka, dengan hormat kami mohon bantuan dan kesediaannya untuk memberikan ijin penelitian bagi mahasiswa kami dibawah ini :

- | | | |
|----|-------------------------|---|
| 1 | Nama | : Fadinda Aisa Wiranadiany |
| 2 | NIM | : 141610101045 |
| 3 | Semester/Tahun | : 2017/2018 |
| 4 | Fakultas | : Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember |
| 5 | Alamat | : Jl. Mastrib 1 No.61 Jember |
| 6 | Judul Penelitian | : Efek Pemberian Sedukan Kopi Robusta (Coffea Canephora) Terhadap Pembentukan Lesi Aterosklerosis Karotis Pada Tikus Wistar (Rattus Norvegicus) Hiperlipidemia |
| 7 | Lokasi Penelitian | : Laboraturium Histologi FKG Universitas Jember |
| 8 | Data/Alat yang Dipinjam | : - |
| 9 | Waktu | : November 2017 s/d Selesai |
| 1 | Tujuan Penelitian | : Untuk mengetahui Efek Pemberian Seduhan Kopi Robusta (coffea Cane phora) terhadap Pembentukan Lesi Aterosklerosis Karotis Pada Tikus Wistar (Rattus Norvegicus) Hiperlipidemia. |
| 11 | Dosen Pembimbing | : 1. drg. Rendra Chiestedy P , MDSc
2. drg. Nadie Fatimatuzzahro , MDSc |

Demikian atas perkenan dan kerja sama yang baik disampaikan terimakasih

an Dekan
Wakil Dekan I,

Dr. drg. DA Susilawati, M.Kes
NIP.196109031986022001



KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI, DAN PENDIDIKAN TINGGI
UNIVERSITAS JEMBER
FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI
Jl. Kalimantan No. 37 Jember ☎(0331) 333536, Fak. 331991

Nomor : 4385 /UN25.8.TL/2017
Perihal : Ijin Penelitian

Kepada Yth
Kepala Bagian Laboratorium Biomedik
Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember
Di
Jember

Dalam rangka pengumpulan data penelitian guna penyusunan skripsi maka, dengan hormat kami mohon bantuan dan kesediaannya untuk memberikan ijin penelitian bagi mahasiswa kami dibawah ini :

- | | | |
|----|-------------------------|--|
| 1 | Nama | : Fadinda Aisa Wiranadiy |
| 2 | NIM | : 141610101045 |
| 3 | Semester/Tahun | : 2017/2018 |
| 4 | Fakultas | : Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember |
| 5 | Alamat | : Jl. Mastrib 1 No.61 Jember |
| 6 | Judul Penelitian | : Efek Pemberian Seduhan Kopi Robusta (<i>Coffea Canephora</i>) Terhadap Pembentukan Lesi Aterosklerosis Karotis Pada Tikus Wistar (<i>Rattus Norvegicus</i>) Hiperlipidemia |
| 7 | Lokasi Penelitian | : Laboratorium Fisiologi FKG Universitas Jember |
| 8 | Data/Alat yang Dipinjam | : - |
| 9 | Waktu | : November 2017 s/d Selesai |
| 1 | Tujuan Penelitian | : Untuk Mengetahui Efek Pemberian Seduhan Kopi Robusta (<i>Coffea Canephora</i>) Terhadap Pembentukan Lesi Aterosklerosis Karotis Pada Tikus Wistar (<i>Rattus Norvegicus</i>) Hiperlipidemia. |
| 11 | Dosen Pembimbing | : 1. drg. Rendra Chiestedy P , MDSc
2. drg. Nadie Fatimatuzzahro , MDSc |

Demikian atas perkenan dan kerja sama yang baik disampaikan terimakasih



an. Dekan
Wakil Dekan I,
Dr. drg. IDA Susilawati, M.Kes
NIP.196109031986022001