



PENGARUH KOPI INSTAN TINGGI GULA DOSIS BERTINGKAT
TERHADAP GAMBARAN HISTOLOGI HEPAR TIKUS PUTIH
Rattusnorvegicus GALUR WISTAR

THE EFFECT OF STRATIFIED DOSES OF HIGH SUGAR INSTANT
COFFEE ON THE HEPAR HISTOLOGICALPROFILEOF WISTAR RATS
Rattusnorvegicus

Lovitasari, Arif Mulyanto, Kurnia Ritma Dhanti
Program StudiTeknologi Laboratorium Medik D4 Fakultas Ilmu Kesehatan
Universitas Muhammadiyah Purwokerto
Jl. LetjendSoepardjoRoestam PO. Box 229 Purwokerto 53181 Telp. (0281)
6844253 Fax. (0281) 637239

Corresponding author : kurniaritmadhanti@ump.ac.id

Abstrak

Dampak dari mengonsumsi kopi instan dengan kadar gula yang tinggi akan menyebabkan peningkatan kadar glukosa dalam darah dan membuat hepar bekerja lebih keras untuk memetabolismenya. Metabolisme yang tidak sempurna dapat menyebabkan kerusakan sel-sel hepar. Tujuan penelitian ini untuk mengetahui pengaruh kopi instan tinggi gula dosis bertingkat terhadap gambaran histologi hepar tikus putih (*Rattusnorvegicus*) galur wistar. Penelitian ini dilakukan secara eksperimental dari bulan April-Juli 2020. Sebanyak 24 ekor tikus putih (*Rattusnorvegicus*) dibagi menjadi 4 kelompok perlakuan. Hasil penelitian dianalisis dengan uji *Chi Square*. Hasil penelitian diketahui adanya hubungan antara dosis kopi instan tinggi gula dengan kerusakan histologi hepar $p < 0,000$. Terdapat perbedaan gambaran histologi hepar tikus antara kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan yang diberikan dosis 4,5 ml/250 g BB/hari, 9 ml/250 g BB/hari dan 13,5 ml/250 g BB/hari. Hasil ini dipengaruhi oleh faktor pengganggu cacing *Taenia taeniaeformis* pada organ hepar.

Kata Kunci : kopi instan, gula, histologi, hepar

Abstract

The impact of consuming instant coffee with high sugar levels will cause an increase in glucose levels in the blood and make the liver work harder to metabolize it. Incomplete metabolism can cause liver cells damage. The purpose of this study was to determine the effect of a stratified dose of high-sugar instant coffee on the liver histology of Wistar strain white rats (*Rattus norvegicus*). This research was conducted experimentally from April to July 2020. A total of 24 white rats (*Rattus norvegicus*) were divided into 4 treatment groups. Data were analyzed by using Chi-Square test. The result showed that there was a relationship between high sugar instant coffee doses and liver histological damage $p < 0,000$. There was a difference in the liver histology of rats between the control group and the treatment group which were given a dose of 4.5 ml / 250 g BW / day, 9 ml / 250 g BW / day and 13.5 ml / 250 g BW / day. This result is influenced by the disrupting factors for *Taenia taeniaeformis* worms in the liver.

Keywords: instant coffee, sugar, histology, liver

Pendahuluan

Kopi merupakan salah satu minuman alternatif yang disukai oleh masyarakat Indonesia maupun negara lain (Bhara, 2009). Menurut *National Coffe Association*, peminat konsumsi kopi terbanyak ditempati oleh usia 25-39 tahun. Pengaruh gaya hidup zaman sekarang serta banyaknya kafe yang mengolah kopi menjadi berbagai macam minuman yang menarik menyebabkan konsumen pada usia tersebut semakin meningkat. Pada tahun 2011, sebanyak 40% dari usia 18-24 tahun mengonsumsi kopi setiap hari. Data ini mengalami peningkatan dari tahun 2010 yang hanya sebesar 31%. Pada tahun 2016, jumlah konsumsi kopi sebagai sumber utama kafein di Indonesia meningkat sebesar 98% dalam 10 tahun terakhir (*National Coffee Association*, 2016). Kafein merupakan zat utama dalam kopi yang digemari oleh masyarakat di dunia. Kandungan kafein pada kopi yang disajikan dengan cara diseduh adalah 95-165 mg per 237 mL kopi, 47-64 mg per 30 mL *espresso*, 63 mg per 237 mL kopi instan, serta 2-5 mg per 237 mL *decaffeinated coffe*. Masyarakat awam beranggapan bahwa mengonsumsi kopi dapat menghilangkan rasa lelah dan kantuk. Mengonsumsi minuman dengan dosis 600 sampai 900 mg kafein per hari dapat menyebabkan insomnia, gelisah, mual, denyut jantung tidak beraturan, otot tremor, dan sakit kepala (Mayo, 2018).

Seiring perkembangan zaman, kehidupan manusia menginginkan serba instan, termasuk dengan minuman (Rukhbaniyahet *et al.*, 2013). Kopi instan mengandung 60-80 mg kafein per cangkir, sedangkan kopi bubuk biasa mengandung 60-120 mg kafein per cangkir (Lane *et al.*, 2008). Masyarakat saat ini banyak yang lebih suka mengonsumsi kopi instan dengan tambahan gula supaya rasanya tidak pahit seperti kopi murni.

Mengonsumsi kopi instan dengan kadar gula tambahan yang tinggi dapat meningkatkan kadar glukosa dalam darah. *American Heart Association* (AHA) menganjurkan bahwa konsumsi gula untuk laki-laki sekitar 9 sendok teh yaitu sebesar 37,5 gram atau sebanyak 150 kalori per hari. Konsumsi gula untuk perempuan sekitar 6 sendok teh, yaitu sebesar 25 gram atau 100 kalori per hari. Bahaya kandungan gula tambahan pada kopi instan terlihat melihat kebiasaan masyarakat yang mengonsumsi kopi 2-3 bungkus perhari. Jumlah tersebut sudah mencakup gula pada makanan, minuman, kudapan, permen dan semua yang dikonsumsi pada hari itu (Darwin, 2013).

Jika hal ini berlangsung terus menerus, dapat terjadi gangguan metabolisme di dalam tubuh dan dapat merusak organ hepar (Orhan *et al.*, 2008). Hepar merupakan tempat metabolisme awal yang masuk ke dalam tubuh. Apabila gula tidak dimetabolisme dengan baik di hepar dapat memicu terjadinya penyakit kanker dan penyakit hepar. Penyakit ini ditandai dengan adanya kenaikan enzim *Alanin Aminotransferase*, *Aspartat Aminotransferase*, Bilirubin, Albumin sebagai penyebab kerusakan hepatosit (Mark and Mescher, 2010).

Kerusakan hepatosit dapat disebabkan oleh glikogenesis hepar yang diinisiasi adanya kandungan glukosa dalam kopi yang dapat menghambat reaksi anti-inflamasi. Penghambatan reaksi ini meningkatkan enzim *Alanin Aminotransferase* (ALT) dan *Aspartat Aminotransferase* (AST) (Puming *et al.*, 2001). Kerusakan sel hepar akan menyebabkan keluarnya enzim ALT sehingga meningkatkan kadar enzim tersebut dalam serum darah. ALT dianggap lebih spesifik untuk menilai kerusakan hepar dibandingkan ASI (Tanoesan, 2009). Kopi tinggi gula yang tidak difiltrasi dapat menyebabkan kerusakan hepatosit dan menunjukkan adanya gambaran nekrosis secara histologi pada tikus dengan pemberian kopi instan tinggi gula (Ohta *et al.*, 2009).

Adanya senyawa senyawa di dalam kopi instan dapat menyebabkan kerusakan organ hepar seperti yang disebutkan di atas, membuat peneliti tertarik untuk mengetahui bagaimana pengaruh konsumsi kopi instan tinggi gula dengan dosis bertingkat terhadap gambaran histology hepar tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur Wistar

Metodologi Penelitian

Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan secara eksperimental dengan rancangan penelitian *Pre Test Control Group Design*. Penelitian dilakukan selama 4 bulan pada tahun 2020 di Laboratorium Terpadu Departemen Zoologi dan Laboratorium Farmakologi Fakultas Farmasi Universitas Muhammadiyah Purwokerto. Variabel penelitian terdiri atas variabel bebas dan variabel terikat. Variabel bebas berupa kopi instan tinggi gula dosis bertingkat sedangkan variabel terikat berupa gambaran histology hepar pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur wistar.

Populasi dalam penelitian ini adalah tikus putih jantan galur Wistar yang berumur 3 bulan dengan berat badan 250-300 gram. Sampel dalam penelitian ini adalah 24 ekor tikus dengan teknik pengambilan sampel menggunakan *Allocation Random Sampling*.

Prosedur Kerja

Adaptasi Hewan Coba

Tikus putih jantan (*Rattus norvegicus*) galur Wistar sebanyak 24 ekor dibagi ke dalam 4 kandang berbeda dan diaklimatisasi selama 1 minggu sebelum diberi perlakuan. Selama masa aklimatisasi, tikus diberi pakan standar dan air. Kemudian dilakukan pengukuran berat badan tikus sebelum perlakuan.

Prosedur Pemberian Perlakuan Hewan Coba

Pemberian intervensi hewan coba dilakukan berdasarkan kelompok perlakuan. Kelompok 1 adalah kontrol negatif, kelompok 2-4 diberikan perlakuan dengan variasi dosis kopi instan sebagai berikut : 4,5 mL/250 gr bb/hari, 9 mL/250 gr bb/hari dan 13,5 mL/250 gr bb/hari.

Prosedur Pengambilan Organ Pasca Perlakuan

Tikus yang sudah selesai perlakuan dimasukkan ke dalam kotak yang sudah terdapat kloroform selama 10-30 menit. Kemudian dilakukan pembedahan untuk diambil organ hepar tikus. Bangkai tikus dimusnahkan dengan cara dikubur.

Prosedur Operasional Pembuatan Preparat Histologi

Preparat histologi dibuat dengan cara memotong organ kemudian difikisasi dengan larutan NaCl Fisiologis 0,9%. Organ kemudian ditrimming dan didehidrasi dengan menggunakan alkohol bertingkat. Tahap infiltrasi dilakukan dengan menggunakan oven inkubator, kemudian dilanjutkan dengan perendaman organ pada campuran xilol dan parafin dengan konsentrasi bertingkat. Tahap embedding dilakukan dengan cara memasukkan organ ke dalam kotak berisi parafin murni cair dan didiamkan selama 24 jam. Parafin kemudian dipotong setebal 6 mm. Pewarnaan dilakukan dengan menggunakan larutan Mayer's hematoxylin. Preparat diamati di bawah mikroskop hingga perbesaran 1000x.

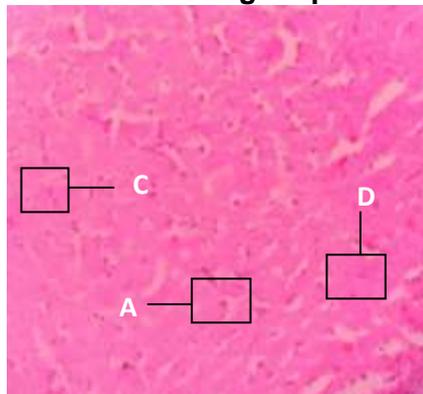
Analisis Data

Data dari hasil penelitian ini dianalisis dengan uji Chi Square (X^2).

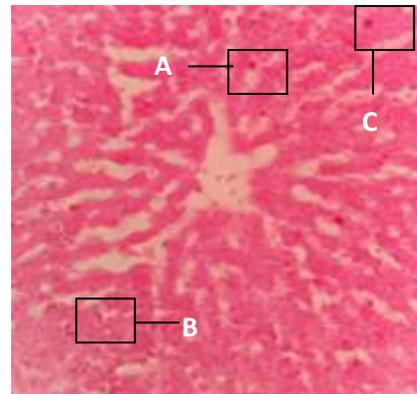
Hasil dan Pembahasan

1. Hasil

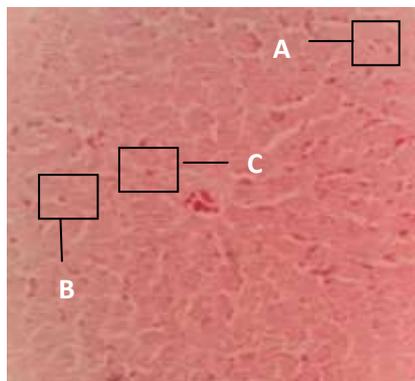
A. Gambaran Histologi Hepar



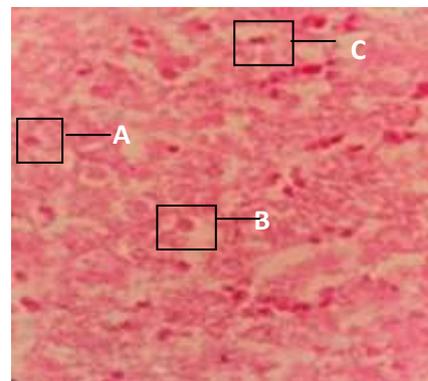
a. Kontrol



b. P1 : 4,5 ml/250gr BB/hari



c. P2 : 9 ml/250gr BB/hari



d. P3 : 13,5 ml/250gr BB/hari

Gambar 1. Gambaran Histologi Sel Hepar Tikus Galur Wistar pada Perbesaran 1000X, Keterangan : A) degenerasi parenkimatososa, B) degenerasi hidropik, C) nekrosis, D) sel normal.

B. Skoring Kerusakan Hepar Tikus Putih

Tabel 1. Hasil Uji *Chi Square* Pengaruh Kopi Instan Tinggi Gula Dosis Bertingkat terhadap Gambaran Histologi Hepar Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Galur Wistar

| Dosis kopi instan tinggi gula | Skoring kerusakan | | | P |
|-------------------------------|-------------------|-----------|-----------|-------|
| | Ringan | Sedang | Berat | |
| 0 ml | 5 (100,0%) | 0 (0,0%) | 0 (0,0%) | 0,001 |
| 4,5 ml | 2 (40,0%) | 3 (60,0%) | 0 (0,0%) | |
| 9 ml | 0 (0,0%) | 4 (80,0%) | 1 (20,0%) | |
| 13,5 ml | 0 (0,0%) | 1 (20,0%) | 4 (80,0%) | |
| Total | 7 (35,0%) | 8 (40,0%) | 5 (25,0%) | |

C. Analisis Kadar Glukosa Darah Sebelum dan Sesudah Perlakuan

Tabel 2. Hasil Analisis Kadar Glukosa Darah pada Tikus Sebelum dan Sesudah Perlakuan (Fadhilah, 2020)

| Glukosa darah | Dosis Kopi Instan Tinggi Gula (mg/dL) | | | | Nilai p |
|-------------------|---------------------------------------|-----------------------|---------------------|------------------------|---------|
| | Kontrol 0 ml Rerata (SD) | P1 4,5 ml Rerata (SD) | P2 9 ml Rerata (SD) | P3 13,5 ml Rerata (SD) | |
| Sebelum Perlakuan | 79,200 (11,032) | 69,800 (11,735) | 59,600 (10,359) | 56,0000 (6,964) | 0,096 |
| Setelah Perlakuan | 85,000 (17,635) | 73,600 (15,388) | 79,400 (20,206) | 84,800 (8,167) | |

2. Pembahasan

Hewan uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus putih jantan (*Rattus norvegicus*) galur Wistar. Hewan uji diukur kadar gula awal (*pre test*). Kelompok tikus kontrol diberi pakan standar dan air minum, sedangkan perlakuan 1 diberi pakan standar, air minum dan larutan kopi instan dosis 4,5 ml/hari, perlakuan 2 diberi pakan standar, air minum dan larutan kopi instan dosis 9 ml/hari dan perlakuan 3 diberi pakan standar, air minum dan larutan kopi instan dosis 13,5 ml/hari selama 18 hari. Sebelum perlakuan, tikus diaklimatisasi terlebih dahulu selama 7 hari untuk mencegah terjadinya stres. Sebelum dilakukan pembedahan untuk diambil organ hepar, diukur kembali kadar gulanya sebagai data *post test*.

Gambaran kerusakan sel hepar di bawah mikroskop cahaya pada Gambar 1 dapat dijelaskan sebagai berikut pada kelompok kontrol, terlihat gambaran sel hepar berupa sel normal dan sel yang mengalami kerusakan yaitu degenerasi parenkimatososa dan nekrosis (Gambar 1.a). Sel normal berbentuk bulat, mempunyai sitoplasma, membran sel tidak rusak dan inti sel tidak padat.

Degenerasi parenkimatososa ditandai dengan sel-sel terlihat membesar. Nekrosis ditandai dengan pecahnya membran plasma. Kelompok perlakuan 1 menunjukkan gambaran sel hepar yang mengalami degenerasi parenkimatososa, degenerasi hidropik dengan jumlah tidak banyak dan nekrosis (Gambar 1.b). Degenerasi parenkimatososa ditandai dengan pembengkakan sel dan kekeruhan sitoplasma. Degenerasi hidropik tetapi tidak banyak. Degenerasi hidropik terlihat dimana sel tampak membesar, sitoplasma pucat dan sitoplasma mengalami vakuolisasi. Nekrosis ditandai dengan pecahnya membran plasma.

Kelompok perlakuan 2 menunjukkan gambaran sel hepar yang mengalami degenerasi parenkimatososa, degenerasi hidropik dan nekrosis (Gambar 1.c). Degenerasi parenkimatososa ditandai dengan pembengkakan sel dan kekeruhan sitoplasma. Degenerasi hidropik terjadi adanya sitoplasma mengalami vakuolisasi, vakuola-vakuola nampak jernih dan terjadi karena peningkatan pemasukan air ke dalam sel kemudian air masuk vakuola-vakuola tersebut. Sitoplasma pucat, sel tampak membesar karena akumulasi air dalam sitoplasma namun inti berada di tengah. Nekrosis ditandai dengan pecahnya membran plasma. Kelompok perlakuan 3 menunjukkan gambaran sel hepar yang mengalami degenerasi parenkimatososa, degenerasi hidropik dan nekrosis (Gambar 1.d). Degenerasi parenkimatososa ditandai dengan pembengkakan sel dan kekeruhan sitoplasma. Degenerasi hidropik terjadi adanya sitoplasma mengalami vakuolisasi, sitoplasma pucat. Nekrosis ditandai dengan nukleus mengkerut, nukleus pecah menjadi lisis, inti gelap, membran sel mengalami lisis sehingga batas antara sel tidak nampak jelas, sitoplasma menghilang.

Terlihat kerusakan berupa nekrosis pada kelompok kontrol, perlakuan 1, perlakuan 2 dan perlakuan 3. Nekrosis ditandai dengan adanya robekan membran plasma dan terjadi perubahan inti yang menyebabkan jejas sel menjadi ireversibel. Kerusakan sel hepatosit berupa nekrosis sampai mengarah pada kondisi hepatosit piknosis, hepatosit karioreksis dan hepatosit kariolisis (Andi, 2018). Kerusakan hepatosit berupa nekrosis ditandai dengan nukleus yang menghitam dan mengalami fragmentasi. Selain itu, hepatosit tampak semakin kecil dan mengkerut sehingga mempunyai bentuk yang tidak teratur (Utomo, dkk, 2012).

Kerusakan hepar tidak hanya disebabkan karena pengaruh pemberian kopi instan, tetapi disebabkan juga adanya cacing *Taenia taeniaeformis*. *T. taeniaeformis* memiliki ukuran panjang 50-60 cm, tidak memiliki leher serta proglotid posteriornya berbentuk bell-shaped, telurnya berbentuk bundar dan berdiameter 31-37 mikron (Subranto, 2006). *T. taeniaeformis* merupakan cacing cestoda yang ditemukan di hepar tikus pada tahap larva dan membentuk sistiserkus di dalam hepar atau pada permukaan (Priyanto, dkk, 2013). Pada penelitian ini, terdapat beberapa cacing yang terlihat pada organ hepar. Cacing *T. taeniaeformis* ditemukan pada kontrol dan perlakuan 1, 2 dan 3 dengan jumlah cacing berturut-turut 10, 4 dan 3 ekor.

Berdasarkan tabel 4.1, kelompok kontrol menunjukkan adanya kerusakan ringan sebanyak 5 (100,0%). Kelompok P1 menunjukkan adanya kerusakan ringan 2 (40,0%) dan sedang 3 (60,0%). Kelompok P2 menunjukkan kerusakan sedang 4 (80,0%) dan berat 1 (20,0%). Kelompok P3 menunjukkan adanya kerusakan sedang 1 (20,0%) dan berat 4 (80,0%). Hal ini menunjukkan bahwa semakin tinggi dosis kopi tinggi gula yang diberikan semakin terlihat kerusakan pada organ hepar. Semakin tinggi dosis pemanis yang diberikan semakin tinggi derajat kerusakan organ heparnya (Andi, 2018).

Tabel 4.2 menunjukkan hasil pemeriksaan kadar gula darah yang dilakukan pada 20 sampel tikus putih sebelum dan sesudah perlakuan. Selisih rerata kadar glukosa darah pada kelompok kontrol, perlakuan 1, perlakuan 2 dan perlakuan 3 secara berturut-turut adalah 5,8 mg/dL, 3,8 mg/dL, 19,8 mg/dL dan 28,8 mg/dL.

Rata-rata kadar glukosa darah setelah perlakuan masih dalam batas normal. Hal ini sesuai pendapat Kusumawati dkk (2004) bahwa kadar gula darah normal pada tikus yaitu berkisar antara 50–135 mg/dL. Hasil penelitian selaras dengan hasil penelitian Munawroh (2009) yang menyatakan bahwa responden kelompok peminum kopi yang menambahkan gula pasir lebih dari 2 sendok memiliki rata-rata kadar glukosa darah lebih tinggi dibanding peminum kopi yang tidak menambahkan gula pasir. Hasil ini selaras dengan penelitian Yustisiana dkk (2013), dengan pemberian kopi robusta tanpa gula didapatkan penurunan rerata kadar glukosa darah puasa dari 91,81 mg/dL menjadi 68,375 mg/dL.

Kopi instan meningkatkan gula darah diduga akibat kandungan gula yang terdapat dalam kopi, dilihat dari komposisi gula yang lebih dominan dibandingkan dengan senyawa yang lain seperti lemak total, protein, serat pangan, natrium, vitamin dan kalsium. Gula yang dikonsumsi tidak hanya terdapat pada gula pasir, gula tebu, maupun gula merah saja. Namun, kandungan gula juga terdapat pada makanan yang mengandung karbohidrat sederhana (tepung, roti, kecap) dan minuman lain yang mengandung gula, seperti minuman bersoda, kopi instan, sirup, dan lain-lain. Kopi murni yang disajikan dengan menggunakan penambahan gula murni dapat memicu menurunnya kandungan alami dalam kopi. Kopi mengandung senyawa alami *chlorogenic acid* dan kafein yang merupakan senyawa polifenol yang menjadi antioksidan kuat dan dapat menghambat absorpsi glukosa dalam tubuh (Yustisiana dkk, 2013).

Kopi instan tinggi gula yang masuk melalui saluran cerna akan mengalami metabolisme awal di hepar. Hepar merupakan tempat metabolisme utama yang akan mendetoksifikasi dan mengeliminasi semua toksin (Crawford, 2005). Kopi dengan dosis gula yang tinggi juga dapat mempengaruhi gambaran histologi pada organ hepar dan metabolisme kopi dalam hepar (Tortora and Derrickson, 2013). Hepar merupakan organ utama yang memiliki fungsi sebagai organ detoksifikasi racun pada tubuh. Keseluruhan zat yang terkandung dalam kopi merupakan senyawa xenobiotik yang dapat menyebabkan kerusakan sel secara langsung. Senyawa ini dapat mengganggu permeabilitas selaput, homeostasis osmosa, keutuhan enzim, dan kofaktor dapat membebani sel tersebut, sehingga menyebabkan jejas serta perubahan morfologi sel. Hal ini dipengaruhi oleh beberapa faktor seperti dosis kopi, durasi pemberian, dan metabolisme masing-masing dari spesies yang digunakan (Akash *et al.*, 2014).

Kesimpulan

Penelitian ini menyimpulkan bahwa terdapat perbedaan gambaran histology hepar tikus antara kelompok control dengan kelompok perlakuan yang diberikan dosis 4,5 ml/250 gr BB/hari, 9 ml/250 gr BB/hari dan 13,5 ml/250 gr BB/hari. Kerusakan paling tinggi terlihat pada tikus dengan dosis 13,5 ml/250 gr bb/hari dibandingkan dengan dosis lain yang lebih rendah.

Ucapan Terima Kasih

Penelitian ini didanai oleh Lembaga Penelitian dan Pengabdian Masyarakat Universitas Muhammadiyah Purwokerto sehingga tim peneliti mengucapkan terima kasih atas dukungan yang diberikan tim dapat menyelesaikan penelitian dengan baik dan tanpa kendala yang berarti.

DaftarPustaka

- Akash, M., Rehman, K. & Chen, S. 2014. Effects of coffee on type 2 diabetes mellitus by PubMed NCBI. *Nutrition*. 30 : 755-763.
- Andi. 2018. *Pathology of the fischer rat: reference and atlas*. Academic Press, California.
- Bhara, M. 2009. Pengaruh pemberian kopi dosis bertingkat per oral 30 hari terhadap gambaran histologi hepar tikus Wistar. *Skripsi*. Universitas Diponegoro, Semarang.
- Crawford, J.M. 2005. Liver and Biliary Tract. In: Kumar V, Abbas AK, Fausto N, Editors. *Robbins and Cotran pathologic basic of disease*. 7th ed. Philadelphia: Elsevier Saunders. p.903.
- Darwin, P. 2013. *Menikmati gula tanpa rasa takut*. Sinar Ilmu : Yogyakarta.
- Fadilah, N. 2020. Efek pemberian kopi instan tinggi gula dosis bertingkat terhadap gambaran histology pancreas tikus jantan (*Rattusnorvegicus*) Galur Wistar. *Skripsi*. Universitas Muhammadiyah Purwokerto, Purwokerto.
- Kusumawati. 2004. Bersahabat dengan hewan coba. Gajah Mada University Press, Yogyakarta.
- Lane, J., Feinglos, M. N., Surwit, R. S. 2008. Caffeine increases ambulatory glucose and postprandial responses in coffee drinkers with type 2 diabetes. *Diabetes Care*. 31(2): 221-222.
- Mark, J and Mescher, A.L. 2010. *Junqueira's basic histology: Text & Atlas*. 12th Ed. New York: The McGraw-Hill Companies. Terjemahan oleh Dany, F. 2012. *Histologi dasar Junqueira: Teks & Atlas*. Edisi 12. EGC, Jakarta.
- Mayo, C. 2018. Caffeine content for coffee, tea, soda and more. <https://www.mayoclinic.org/healthylifestyle/nutrition-and-healthy-eating/in-depth/caffeine/art-20049372>. Accessed : 12 Februari 2020.
- Munawroh. 2009. Teknik pembuatan preparat histologi dan jaringan hewan dengan pewarnaan Hematoksilin dan Eosin (HE). Balai Penelitian Veteriner, Bogor.
- National Coffee Association. 2016. Pengaruh kopi terhadap kadar gula darah post prandial, p: 1-2.
- Priyanto D, Rahmawati, Ningsih DP. 2013. Identification of endoparasites in rats of various habitats. *Health Science Indonesia*. 5(1): 49-53.
- Puming, H.E., Yasuhiro, N., and Kimio, S. 2001. Suppressive effect of coffee on lipopolysaccharide-induced hepatitis in d-galactosamine- sensitized rats. *Department of Applied Biological Chemistry*. Japan. 65 (8),1924-1927.
- Rukhbaniyah L.Y, Dyah P.U dan Istiko A.W. 2013. Perilaku konsumen terhadap kopi tubruk dan kopi instan di Kecamatan Pejagoan Kabupaten Kebumen. *Surya Agritama*. 2(1): 31-39.
- Ohta, A., Lukashev, D., Edwin, K.J., Bertil, B.F., and Michail, S. 2009. Trimethylxanthine (Caffeine) may exacerbate acute inflammatory liver injury by weakening the physiological immunosuppressive mechanism. *Journal of Immunology*. 179(11): 7431-7438.
- Orhan, K.P., Ibrahim, H.B., Huseyin, A., Kerem, A., Adile, F.D., Mehmet, Y., and Bilal, U. 2008. Effect of unfiltered coffee on carbon tetrachloride-induced liver injury in rats. *Inflammation*. 31(6): 408-413.
- Subronto. 2006. *Penyakit infeksi parasit dan mikroba pada anjing dan kucing*. UGM Press, Yogyakarta.
- Tanoesan. 2009. Strategi mengalahkan komplikasi diabetes dari kepala sampai kaki. Jakarta : PTGamedia.
- Tortora, G. J. and Derrickson, B. 2013. *Principles of anatomy & physiology*. 14th edition. Hoboken, John Wiley & Sons, Inc.

- Utomo Y, Hidayat A, Dafip M, Sasi FA. 2012. Studi histopatologi hati mencit (*Mus musculus* L.) yang diinduksi pemanis buatan. *Jurnal MIPA* 35 : 122-129
- Yustisiani A., Desy A., Isbandiyah. 2013. Pengaruh pemberian kopi terhadap penurunan kadar glukosa darah pada tikus putih strain Wistar diabetes mellitus tipe 2. *Fakultas kedokteran universitas muhammadiyah malang*. 9(1):38-45