



PENGARUH PEMBERIAN EPINEFRIN BERBAGAI KONSENTRASI TERHADAP BERAT TESTIS MENCIT (MUS MUSCALUS) STRAIN JEPANG

THE EFFECT OF EPINEFRIN VARIOUS CONCENTRATIONS TO THE WEIGHT OF TESTIS IN MALE MICE (MUS MUSCALUS) JAPANESE STRAINS

Dessy abdullah¹, Mutiara Anissa²

^{1,2}Universitas Baiturrahmah

dessyabdullah@yahoo.co.id./081374359819

ABSTRAK

Infertilitas atau ketidaksuburan bukan hanya merupakan tanggung jawab isteri, tetapi juga termasuk tanggung jawab pihak suami. Suatu penelitian menunjukkan bahwa sekitar 30 - 40 yo penyebab infertilitas ternyata kesalahannya terdapat pada pihak suami. Banyak faktor penyebab terjadinya infertilitas pria, yang salah satunya adalah terjadinya gangguan pada proses spermatogenesis (proses pembentukan dan pematangan sel benih pria). Proses spermatogenesis ini terjadi didalam tubuli seminiferi testis melalui tahapan-tahapan tertentu dan dikendalikan oleh hormonal yakni hormon testosteron. Salah satu penyebab infertil pada pria adalah stress yang berkepanjangan yang menyebabkan terganggunya frekwensi Gonadotropin Releasing Hormone yang penting untuk sekresi LH dan FSH. Epinefrin sebagai salah satu stressor bahan kimia sering digunakan sebagai salah satu terapi. Selain itu stressor juga dapat mengaktifkan sistem saraf simpatis (pelepasan norepinefrin) dan respon adrenal (pelepasan epinefrin). Peningkatan kadar epinefrin dan norepinefrin dapat meningkatkan pulsasi GnRH. Bila peningkatan pulsasi ini berlebihan dapat menurunkan dan menghentikan selasi FSH dan LH. Sehingga penelitian ini bertujuan untuk membuktikan pengaruh pemberian epinefrin bezulng terhadap berat testis dan jumlah spermatozoa. Pemberian injeksi subkutan epinefrin dilakukan setiap hari selama 35-36 hari (selama 1 siklus proses spermatogenesis mencit) sebanyak satu kali sehari. Metodologi. Pada penelitian ini menggunakan 25 ekor mencit yang dibagi dalam 5 kelompok berdasarkan perbedaan konsentrasi epinefrin. Selama 36 hari, 25 ekor mencit mendapat perlakuan pemberian epinefrin injeksi secara sub kutan dengan konsentrasi 0,002 mg/ml, 0,004 mg/m[, 0,006 mg/ml, 0,01 mg/ml, sisanya diperlakukan sebagai kelompok kontrol. Hasil. Hasil yang diperoleh kemudian dianalisa dengan metode ANOVA dan dilanjutkan dengan multiple comparisons jenis Bonferroni untuk membandingkan signifikansi tersebut. Hasil penelitian dibandingkan dengan kontrol. Kesimpulan untuk berat testis pada konsentrasi 0,006 telah menunjukkan sipifikansinya

Kata kunci : berat testis, epinefrin, infertiltas

ABSTRACT

Infertility is not only the responsibility of the wife, but also includes the responsibilities of the husband. A study showed that about 30-40 yo causes of infertility Apparently the mistake is found on the husband's party. Many factors cause male infertility, one of which is a disorder in the process of spermatogenesis (formation and maturation of male seed cells). The process of spermatogenesis occurs in Tubuli seminiferi testicles through certain stages and is controlled by hormonal hormones namely testosterone. One of the causes of infertile in men is prolonged stress which causes the disruption of Gonadotropin Releasing Hormone



frequency which is important for the secretion of LH and FSH. Epinephrine as one of the stressor chemicals is often used as one therapy. In addition the stressor can also activate the sympathetic nervous system (release of norepinephrine) and adrenal response (release of epinephrine). Elevated levels of epinephrine and norepinephrine may increase the pulsation of GnRH. When this increase in pulsation can be decreased and stops the FSH and LH Selaesi. So this research aims to prove the influence of epinephrine bezulnng to the weight of testicles and the amount of spermatozoa. The administration of subcutaneous injection of epinephrine is carried out daily for 35-36 days (during 1 cycle of the mice process spermatogenesis) once a day. Methodology. In this study using 25 mice were divided into 5 groups based on differences in the concentration of epinephrine. During 36 days, 25 mice were given a sub-cutaneous injection of epinephrine with a concentration of 0.002 mg/ml, 0.004 mg/m [, 0.006 mg/ml, 0.01 mg/ml, the remainder treated as a control group. Results. The results were then analyzed by the ANOVA method and continued with the multiple comparisons type Bonferroni to compare the significance. Research results compared to controls. The conclusion to the testicular weight at concentrations 0.006 has shown its sipifikanation

Keywords: Testicular weight, epinephrine, infertility

PENDAHULUAN

Latar Belakang

Infertilitas atau ketidaksuburan bukan hanya merupakan tanggung jawab istri, tetapi juga termasuk tanggung jawab pihak suami. Suatu penelitian menunjukkan bahwa sekitar 30-40% penyebab infertilitas ternyata kesalahannya terdapat pada pihak suami (Asmirandah;2005,Syamsuhadi A;2007). Banyak factor penyebab terjadinya infertilitas pria yang salah satunya adalah terjadinya gangguan pada proses spermatogenesis (proses pembentukan dan pematangan sel benih pria). Proses spermatogenesis ini terjadi dalam tubuli seminiferi testis melalui tahapan-tahapan tertentu dan dikendalikan oleh hormonal yakni hormon testosterone. Hormon testosterone ini dihasilkan oleh kelenjar testis melalui ransangan hormone gonadotropin yang dihasilkan oleh kelenjar hipofise anterior (anton DW,2008). Hormon Gonadotropin yang dihasilkan oleh kelenjar hipofise anterior tersebut adalah Luteinizing hormone (LH) dan Folikel stimulating hormone (FSH). LH merupakan regulator sel leydig sementara FSH sebagai regulator sel sertoli yang terdapat dalam tubuli seminiferi testis. Agar proses spermatogenesis berjalan dengan baik diperlukan kerja sama yang baik dan konsisten antara 3 kelenjar yang terdapat dalam tubuh yakni kelenjar hipotalamus, kelenjar hipofise anterior dan testis. Hubungan kerja sama ke 3 kelenjar ini dinamakan dengan istilah poros hipotalamus – hipofise – testis. Ketiga kelenjar ini harus bekerja secara baik dan saling kontrol satu sama lainnya. Apabila salah satu dari ketiga kelenjar ini terganggu, maka akan berakibat pada kelangsungan proses spermatogenesis dan lebih jauh terhadap proses reproduksi. Dalam hal ini ternyata testis punya peranan penting dalam proses reproduksi pria, karena kecuali punya fungsi sebagai organ yang memproduksi sel-sel benih, juga mempunyai fungsi lain yaitu sebagai organ yang menghasilkan hormon testosterone. Seperti diketahui bahwa hormon testosterone inilah yang berperan dalam pengendalian proses spermatogenesis (Taher ;2007,Sunarto;2008). Secara umum penyebab terjadinya infertilitas pria dapat dibagi atas 3 kategori yaitu : Pretestikuler, Testikuler, Post testikuler. Dalam tulisan ini yang akan dibicarakan adalah yang terkait dengan faktor testikuler, yaitu merupakan faktor yang terjadi dalam testis itu sendiri. Faktor testikuler ini biasanya terjadinya gangguan pada proses spermatogenesis sehingga tidak dihasilkan sel-sel benih yang memadai baik secara kwantitas maupun secara kualitas. Keadaan inilah yang menyebabkan seseorang pria jadi infertil.

Berbagai kelainan atau penyakit yang dapat menyebabkan gangguan testikuler sehingga mengganggu pada proses spermatogenesis dan selanjutnya akan menyebabkan infertil antara lain adalah: kriptorkhismus varikokel .Radiasi orchitis kelainan bawaan seperti sindroma Klinefelter hormonal stress Dalam tulisan ini akan difokuskan pada pembicaraan yang berhubungan dengan faktor stress, karena stress merupakan salah satu faktor yang dapat menyebabkan infertilitas pria

Sebagaimana diketahui bahwa setiap orang akan mengalami keadaan stress didalam kehidupannya. Namun tentu tidak setiap individu yang mengalami stress akan mengalami infertil. Hal ini tergantung pada berat ringan dan jangka waktu stress yang dialami oleh seseorang tadi. Stress yang akan menyebabkan infertil adalah stress yang berat dan waktu yang cukup lama. Setiap orang mengalami sesuatu yang disebut stress sepanjang kehidupannya, stress dapat memberi stimulus terhadap perubahan dan pertumbuhan, namun demikian, terlalu banyak stress dapat mengakibatkan penyesuaian yang buruk, penyakit fisik, dan ketidakmampuan mengatasi terhadap masalah . Yatkin dan Labban (1992) menyatakan adanya hubungan antara peristiwa kehidupan yang menegangkan atau penuh stress dengan berbagai kelainan fisik dan psikiatrik. (Potter,1997). Stress adalah segala situasi dimana tuntutan non spesifik mengharuskan seorang individu untuk berespon atau melakukan tindakan. Sedangkan stressor adalah stimuli yang mengawali atau mencetuskan perubahan. Stressor menunjukkan suatu kebutuhan yang tidak terpenuhi dan kebutuhan tersebut bisa saja kebutuhan fisiologis, psikologis, sosial, lingkungan, perkembangan, spiritual atau kebutuhan kultural. Respon terhadap segala bentuk stressor bergantung pada fungsi fisiologis, kepribadian, dan karakteristik perilaku, seperti juga halnya sifat dari stressor tersebut. (Potter,1997)

Stressor baik fisik, kimia, dan psikologis dapat mengaktifkan sistem saraf simpatis dan respon adrenal. (Edward, 1993). Aktivasi sistem saraf simpatis oleh stressor dapat menyebabkan pelepasan neurotransmitter norepinefrin (NE) lokal pada ujung saraf simpatis postganglionik, sedang aktivasi stressor pada medula adrenal dapat merangsang lepasnya epinefrin (E) ke dalam sirkulasi. (Norman,1987). Epinefrin mempunyai sifat yang unik yaitu memodulasi sejumlah norepinefrin (NE), dimana norepinefrin yang dilepaskan akan diduplikasi dan dikuatkan oleh epinefrin yang mencapai tempat yang sama melalui sirkulasi. (Cunningham,2002; Ganong,2001). Stresor fisik,

kimiawi, dan psikologis dapat mempengaruhi frekuensi dan amplitudo pulsatif dari Gonadotropin Releasing Hormone (GnRH). Hal ini penting bagi sekresi Follicle Stimulating Hormon (FSH) dan Luteinizing Hormone (LH). Selain itu stressor juga dapat mengaktifkan sistem saraf simpatis (pelepasan norepinefrin) dan respon adrenal (pelepasan epinefrin). Peningkatan kadar epinefrin dan norepinefrin dapat meningkatkan pulsasi GnRH. Bila peningkatan pulsasi ini berlebihan dapat menurunkan dan menghentikan sekresi FSH dan LH. Penurunan FSH dan LH akan mengganggu produksi hormon testosteyron dan selanjutnya mengganggu proses spermatogenesis. Epinefrin sebagai salah satu stressor bahan kimia sering digunakan sebagai salah satu terapi, sehingga penelitian ini bertujuan untuk membuktikan pengaruh pemberian epinefrin secara berulang terhadap berat testis dan jumlah spermatozoa. Pemberian injeksi subkutan epinefrin dilakukan setiap hari selama 35-36 hari (selama 1 siklus proses spermatogenesis mencit). Sejauh ini belum ada penelitian yang secara jelas melaporkan apakah pemberian epinefrin dapat mempengaruhi berat testis dan jumlah spermatozoa yang merupakan parameter untuk dapat mendiagnosa infertilitas pria maka untuk hal tersebut dilakukan penelitian dengan menggunakan hewan coba. Adapun hewan coba yang digunakan adalah mencit (*Mus Musculus*). Hal ini didasari karena hewan coba ini mudah didapat, harga relatif murah, pemeliharaan tidak terlalu sulit, biaya perawatan murah dan mencit juga dapat digunakan untuk mewakili mamalia termasuk manusia (Andreas et al, 1992). Berdasarkan latar belakang permasalahan diatas maka rumusan permasalahannya adalah: "Apakah pemberian epinefrin dengan dosis terapeutik dapat mempengaruhi berat testis mencit jantan?" penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian epinefrin terhadap berat testis dan jumlah spermatozoa mencit (*mus musculus*) strain Jepang. Mengetahui efek pemberian epinefrin dengan konsentrasi: 0,002 mg/ml, 0,004 mg/ml, 0,006 mg/ml, 0,01 mg/ml terhadap berat testis mencit (*Mus musculus*) strain Jepang.

METODE PENELITIAN

Jenis penelitian yang akan dilakukan adalah penelitian eksperimental laboratoris dengan menggunakan rancangan penelitian *post test only control group design*. (Zainuddin,2000) .Tempat penelitian Laboratorium biologi fakultas kedokteran universitas andalas dilakukan pada tahun 2007. Populasi dan Sampel diambil dari populasi yang

tidak terbatas umur sekitar 2 bulan,dengan berat badan rata-rata 25-35 mg. Besar Sampel dihitung dengan rumus *Federer*, dengan perhitungan sebagai berikut :

$$\text{RUMUS : } (n-1)(n-t) \geq 15$$

$$n \geq 16$$

Pemberian dosis epinefrin berdasarkan rumus metode Thomsons, untuk menentukan barisan dosis antara dosis tertinggi dan dosis terendah dalam suatu percobaan.

Pembagian kelompok hewan coba

| Perlakuan | Ulangan | | | | | jumlah | rata-rata |
|-----------|---------|-----|-----|-----|-----|--------|-----------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | | |
| Kontrol | 105 | 100 | 103 | 100 | 102 | 510 | 102 |
| [0,002] | 105 | 102 | 100 | 98 | 104 | 509 | 101,8 |
| [0,004] | 100 | 98 | 100 | 99 | 102 | 509 | 99,8 |
| [0,006] | 98 | 96 | 98 | 99 | 100 | 491 | 98,2 |
| [0,01] | 84 | 80 | 80 | 76 | 78 | 398 | 79,6 |

Pembagian kelompok hewan coba dilakukan secara simple random sampling. Dengan menggunakan sistem acak , 25 ekor mencit dibagi menjadi 5 kelompok yaitu :

1. Kelompok kontrol / posttest : 5 ekor mencit, pada kelompok ini diambil vas deferennya sebagai data kontrol posttest dengan cara pembedahan.
2. Kelompok 1 : 5 ekor mencit diberi injeksi subkutan epinefrin konsentrasi 0,002 mg/20 gram BB sebagai data kelompok satu posttest
3. Kelompok 2 : 5 ekor mencit diberi injeksi subkutan epinefrin konsentrasi 0,004 mg/20 gram BB sebagai data kelompok satu posttest
4. Kelompok 3 : 5 ekor mencit diberi injeksi subkutan epinefrin konsentrasi 0,006 mg/20 gram BB sebagai data kelompok satu posttest
5. Kelompok 5 : 5 ekor mencit diberi injeksi subkutan epinefrin konsentrasi 0,01 mg/20 gram BB sebagai data kelompok satu posttest

Tiap kelompok diberikan perlakuan sesuai dengan kategorinya. Diinjeksikan selama 36 hari.pada hari ke 38 dimatikan dengan melakukan pematihan batang otak. Pembedahan Pembedahan, laparatomi, vas deferen diidentifikasi dan dilakukan pemotongan vas deferen. Pengolahan Data meliputi *Editing, Coding, Entry data, Tabulating* . Metode Analisa Data yaitu Hasil diolah secara statistik dengan menggunakan uji ANOVA dengan derajat kepercayaan 95%. Jika didapat hasil yang bermakna dilanjutkan dengan uji statistik Multiple Comparisons (Post hoc Test) jenis Bonferroni.

HASIL PENELITIAN

Dari penelitian ini ingin diketahui pengaruh epinefrin berbagai konsentrasi terhadap berat testis dan jumlah spermatozoa yang dilakukan terhadap mencit (*Mus musculus*) strain jepang.

Berat testis

Hasil penimbangan berat testis disajikan dalam tabel 4.1.

Tabel 4.1. Berat testis (mg) setelah pemberian epinefrin masing-masing satu kali sehari selama 36 hari secara subkutan.

Tabel 4.2 Hasil uji statistik multiple comparisons berat testis setelah perlakuan ($\alpha < 0,05$)

| (I) konsentrasi epinefrin | (J) konsentrasi epinefrin | Mean Difference (I-J) |
|---------------------------|---------------------------|-----------------------|
| Kontrol | konsentrasi 0,002 | .20 |
| | konsentrasi 0,004 | 2.20 |
| | konsentrasi 0,006 | 3.80 |
| | konsentrasi 0,01 | 22.40(*) |

PEMBAHASAN

Pada tabel 4.1. rata-rata berat testis mencit kontrol adalah 102 mg, sedangkan berat testis perlakuan mengalami penurunan sesuai dengan makin besarnya konsentrasi yang diberikan maka makin kecil berat testis. 101,8 mg pada pemberian epinefrin dengan konsentrasi 0,002 mg/ml. 99,8 mg pada pemberian epinefrin konsentrasi 0,004 mg/ml. 98,2 mg pada pemberian epinefrin 0,006 mg/ml dan penurunan yang signifikan pada pemberian epinefrin konsentrasi 0,01 mg/ml yaitu 79,6 mg. Setelah dilakukan uji analisis data dengan menggunakan uji statistik One Way ANOVA menunjukkan perlakuan yang diberikan pada masing-masing kelompok memberikan perbedaan rata-rata berat testis mencit yang bermakna. Oleh karena itu, uji statistik dilanjutkan dengan uji Multiple Comparisons (Post hoc tes) jenis Bonferroni.

Dari tabel 4.2. diketahui bahwa kontrol dengan kelompok perlakuan dengan konsentrasi 0,002 ml/mg, 0,004 mg/ml, 0,006 mg/ml tidak menunjukkan perbedaan rata-rata berat testis yang bermakna ($\alpha < 0,05$) dan baru bermakna jika dibandingkan dengan kelompok perlakuan dengan konsentrasi 0,01 mg/ml.

KESIMPULAN DAN SARAN

Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian pemberian epinefrin

injeksi dalam berbagai tingkatan konsentrasi yang disuntikkan selama 36 hari sebanyak 1x sehari terhadap jumlah spermatozoa mencit (*Mus musculus*) strain jepang dapat disimpulkan sebagai berikut:

Pemerian epinefrin injeksi dengan berbagai tingkatan konsentrasi memberikan makna pada berat testis mencit di konsentrasi 0,006 mg/ml dan 0,01 mg/ml.

Secara statistik penurunan rata-rata berat testis sangat bermakna

Dari penelitian ini adalah pemberian epinefrin dengan dosis yang tinggi dapat menyebabkan penurunan berat testis.

Saran

Dapat dilakukan penelitian lanjutan dengan melihat variabel lain yang dapat mendukung penelitian ini

DAFTAR PUSTAKA

- Amori (1996). "*Mus musculus*", (http://www.wikipedia.org/wiki/mus_musculus) diakses 12 April 2008.
- Asmarinah, 2005. Mutasi gen pada pria infertil dengan astenozoospermia. Penerbit UI press
- Campbell, N.A., J.B. Reece & L.G. Mitchell. (1999) *Biology Fifth edition*. (alih bahasa Wasmen Manalu). Benjamin Cummings, Menlo Park.
- Cherry, S.H. (1986). *Bimbingan Ginekologi Perawatan Modern Untuk Kesehatan Wanita* (alih bahasa noname). CV Pionir Jaya. Bandung.
- Cunningham JG, 2002. Textbook of Veterinay Physiology, 3rd edition WB. Souinders Company. Philadelphia pp: 356-357.
- Edward L, Fox L, Browers RW, Merle L, (1993). *The Physiological basis for exercise & sport*. Brown and Bencharmark.
- Emil Steiberger, M.D. *Androgens In Male Infertility*. Current Theraphy of Infertility. 1983.
- Ganong WF, 2001. Review of medical physiology, 20th ed. Appleton and large, Stanford, Connecticut pp:545-567.
- Griffin FJT, 1989. Stress and Immunity: a unifying concept. *Veterina Immunol. Immunopathol.* 20: 41-48.



- Guyton AC, Hall JE, 1997. Fungsi Reproduksi dan Hormonal Pria. Buku Ajar Fisiologi Kedokteran, Edisi 9, Jakarta: EGC, Hal 1265-1282
- Guyton AC, 2000. Textbook of Medical Physiology, 10th ed. West Washington Square: WB Saunders Company pp: 1284-1298.
- Hafez ESE, 1993. Reproduction in farm animals. Edisi 6. Philadelphia: Lea dan Febiger. Pp 114-120.
- H.G. Burger. Spermatogenesis and its endocrine Function. Human Semen and Infertility Regulation. 1976 Hedge GA, Colby HD,
- Goodman RL, 1987. Clinical Endocrine Physiology. Philadelphia. WB Saunders. Pp:300
- Holy, T., Z. Guo. 2005. Ultrasonic songs of male mice. *Public Library of Science, Biology*. <http://biology.plosjournals.org/perlserv/?request=get-document&doi=10.1371/journal.pbio.0030386> diakses 20 juni 2008.
- Ismudiono, 1999. Fisiologi reproduksi pada ternak. Edisi 2, Surabaya: Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga, hal 70-79
- Junqueira LC, Carneiro J, Kelley RO, 1995. Sistem Reproduksi Pria. Histologi Dasar, Edisi ke-8, Jakarta: Penerbit Buku kedokteran EGC, hal 19-58.
- Kusumawati, 2004. Bersahabat dengan hewan coba, Penerbit Gajah Mada University Press, hal 6-8.
- Laatikainen TJ, 1991. Corticotropin-releasing hormone and peptides in reproduction and stress *an med* 23(5): 489-496.
- Leeson, C. Roland (1987). Textbook of Histology. Alih bahasa: Yan Tambayong, dkk. Penerbit Buku Kedokteran EGC, Jakarta.
- Mansjoer A, Triyanti K, Savitri R, Wardhani WI, Setiowulan L, 1999. Kapita Selekta Kedokteran. Media Aesculapius, Jakarta
- Norman AW, Litwack G, 1987. Hormone. Academic Press, Inc, San Diego New York. Boston, 450-469.
- Oentoeng, S. (2000). *Simposium Kesehatan Reproduksi Pria*. Bagian Biologi Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia.
- Potter and Perry (2005). *Fundamentals of Nursing: concepts and Process & Practice*. Alih Bahasa: Yasmin Asih, dkk. Penerbit Buku Kedokteran EGC.
- Pacak karel and Polkovits, 2001. Stressor specificity of Central Neuroendocrine Responses Implication for Stress-Related Disorder. Endocrine Society. Pp.534
- Prendergast, Herashezg A, and Dalakin A, 2002. GnRH-Gonadotrophin physiology and pathology.
- Rugh R, 1967. The Mouse Its Reproduction and Development. Minneapolis: Burgess, pp 7-24.
- Santoso S, 2004. Buku Latihan SPSS Statistik Parametrik. Elex Media Komputindo, edisi 4. Gramedia Jakarta.
- Silverthorn DV, Ober WC, Garrison WC, Silverthorn AC, 2001. Human Physiology on Integrate Approach, 2nd Ed, New Jersey: Prentice-Hall Inc, pp 505 - 519
- Siswandono, 1995. Kimia Medisinal, Penerbit Airlangga Press. hal 642-650
- Smith B dan Mangkoewidjojo S, 1988. Pemeliharaan, pembiakan dan penggunaan hewan percobaan didaerah tropis. Edisi 1, UI press; Universitas Indonesia hal 11-24.
- Speroff L, Glass RH, Kase NG, 1994. Clinical Gynecologic Endocrinology and Infertility, 5th ed, Williams and Wilkins.
- Sunarto, 2005 http://www.dinkesjatim.go.id/berita-detail.html?news_id diakses maret 2008
- Syamsuhadi dr ; 2007. "Infertilitas bisa terjadi pada pria" <http://hal-wanita.blogspot.com>. diakses juni 2008.
- Vander A, Sherman J, Luciano D, 2001. The Mechanism of Body Function. In Human Physiology, New York : McGraw-Hill



Company, pp 639-649.

Turner CD, Bagnara JT, 1976. General Endocrinology. WB Saunders. Co.pp 449-642

www.balita-anda.indoglobal.com. diakses 1 juli 2008.

www.geocities.com/kuliah_farm/praktikum_farmakologi/hewan_coba.doc, diakses maret 2008

Zainuddin.M (2000). Metodologi Penelitian. Universitas Airlangga Press. Surabaya.
