

## **Histopatologi Usus Halus Tikus Putih Jantan yang Diberikan Deksametason dan Vitamin E**

*(HISTOPATHOLOGY SMALL INTESTINE OF MALE WHITE RATS THAT WERE DEXAMETHASONE AND VITAMINE E SUPPLEMENTED)*

**Kadek Karina Dewi Wijyanthi<sup>1</sup>, I Ketut Berata<sup>2</sup>, Samsuri<sup>3</sup>, I Wayan Sudira<sup>3</sup>**

<sup>1</sup>Praktisi Dokter Hewan di Denpasar, <sup>2</sup>Laboratorium Patologi Veteriner, <sup>3</sup>Laboratorium Farmakologi dan Farmasi Veteriner, Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Udayana, Jln. PB. Sudirman Denpasar Bali, Email: [karinaramansa@gmail.com](mailto:karinaramansa@gmail.com)

### **ABSTRAK**

Deksametason telah diketahui sebagai obat kortikosteroid sintetik yang banyak digunakan oleh masyarakat. Jika deksametason digunakan dalam jangka waktu panjang dan pemakaian dosis besar, menyebabkan stres oksidatif pada sel akibat akumulasi radikal bebas yang menyebabkan kematian sel pada jaringan organ tubuh. Vitamin E diketahui memiliki peran yang baik sebagai antioksidan. Saat ini belum diketahui efek samping pemberian deksametason dan vitamin E terhadap kerusakan usus halus tikus putih (*Rattus norvegicus*). Penelitian ini menggunakan sampel 25 ekor tikus putih jantan, dibagi dalam 5 kelompok perlakuan, yaitu kontrol negatif (P0), kontrol positif (P1) diberikan deksametason Harsen 0.13 mg/kg, dan perlakuan diberikan deksametason Harsen 0.13 mg/kg dengan variasi vitamin E (Natur-E) bertingkat yaitu P2 (100 mg/kg), P3 (150 mg/kg), dan P4 (200 mg/kg). Setelah perlakuan diberikan selama 2 minggu, tikus dinekropsi dan usus halus diambil untuk selanjutnya dibuat sediaan histopatologi dengan pewarnaan hematoksilin-eosin (HE). Hasil menunjukkan perlakuan P1 terlihat nekrosis berat (kaseosa) pada usus halus, sedangkan seluruh perlakuan P2, P3, dan P4 berpengaruh terhadap perbaikan kerusakan akibat efek samping deksametason. Perlakuan 4 (P4) sebagai hasil paling baik dalam mengurangi efek samping deksametason.

Kata kunci: Histopatologi, deksametason, vitamin E, antioksidan, usus halus

### **ABSTRACT**

Dexamethasone it's in period a synthetic corticosteroid drug that widely used by the public. If it used for long time and the use of large doses, causing oxidative stress in cells due to the accumulation of free radicals which may cause cell death in the body organs tissues. Vitamin E was known to have a good role as an antioxidant effect. Currently, unknown effects of dexamethasone and vitamin E administration on damage of the small intestine of rat (*Rattus norvegicus*). This study used an experimental design. Samples 25 male rats were divided into 5 groups, namely the negative control or no treatment (P0), positive control (P1) was given dexamethasone Harsen 0.13 mg/kg, and the treatments were given dexamethasone Harsen 0.13 mg/kg with a varieties of vitamins E (Natur-E) multilevel namely P2 (100 mg / kg), P3 (150 mg / kg), and P4 (200 mg / kg). After the treatment was given for 2 weeks, the mice at necropsied and the small intestine were taken for histopathological examination using hematoxyline-eosin staining. Results showed treatment P1 found severe necrosis (*caseosa*) in the small intestine, while the entire treatment P2, P3, and P4 affect the repair of damage due to effects of the dexamethasone. Treatment 4 (P4) was the best results in reducing the effects of dexamethasone.

Keywords: Histopathology, dexamethasone, vitamin E, antioxidant, small intestine.

## PENDAHULUAN

Saat ini modifikasi preparat kortikosteroid terus berkembang pesat, mengingat kortikosteroid sudah dianggap sebagai obat “dewa” karena banyak penyakit dapat diobati dengan obat ini, misalnya anafilaktik, serangan asma yang berat dan beberapa penyakit lainnya. Preparat kortikosteroid dengan sintesa baru, menyebabkan kortikosteroid sintetis tidak lagi dianggap sebagai obat baru (Indranarum dan Marowardoyo, 2003). Salah satu jenis kortikosteroid sintetis adalah deksametason.

Deksametason merupakan salah satu kortikosteroid sintetis terampuh karena kemampuannya dalam menanggulangi peradangan dan alergi kurang lebih sepuluh kali lebih hebat dari pada yang dimiliki prednison (Katzung, 2002). Deksametason mempunyai potensi anti inflamasi yang sangat kuat serta memiliki nilai ekonomi yang tinggi. Karena harganya yang murah dan mudah didapat, mengakibatkan deksametason masih menjadi obat andalan untuk terapi inflamasi (Samsuri et al., 2011). Deksametason yang merupakan salah satu obat golongan kortikosteroid sintetis yang banyak digunakan masyarakat, dalam penggunaan jangka waktu yang lama bisa menimbulkan efek buruk bagi tubuh. Salah satunya penurunan kadar glukosa serum secara signifikan (Samsuri et al., 2011).

Efek samping penggunaan deksametason tersebar luas di beberapa organ. Pemberian deksametason pada tikus menyebabkan kerusakan yang serius pada beberapa organ misalnya pada pankreas, hati, ginjal dan lambung (Kusumaadhi, 2010; Ranta et al., 2006; Ridho, 2010; Sativani, 2010). Dilaporkan juga bahwa pemberian deksametason pada hewan coba tikus yang dikombinasikan dengan pemberian vitamin E dapat mengurangi efek samping dari deksametason di beberapa organ seperti pankreas dan hati (Dharma et al., 2015; Insani et al., 2015).

Pada saat ini belum ada informasi lebih lanjut mengenai efek samping pemberian deksametason yang dikombinasikan dengan vitamin E terhadap kerusakan usus halus. Usus halus dianggap sebagai organ pengabsorpsi obat oral, akan tetapi usus halus juga memiliki kemampuan untuk metabolisme obat dari beberapa jalur pemberian obat seperti injeksi secara subkutan (Renwick dan George, 1989; Ilett et al., 1990; Krishna dan Klotz, 1994). Hampir semua enzim metabolisme obat yang ada di hati ditemukan pula di usus halus, akan tetapi kadar enzim umumnya jauh lebih rendah di usus halus dari pada di hati (Lin et al., 1999). Secara anatomis, usus halus memiliki hubungan langsung dengan hati. Dengan demikian, jumlah obat yang mencapai sirkulasi sistemik setelah dimetabolisme oleh hati dapat diabsorpsi dengan baik oleh usus. Meskipun secara luas diyakini bahwa hati adalah tempat utama dari metabolisme lintas pertama, studi terbaru menunjukkan bahwa usus halus memberikan peran yang signifikan terhadap proses terjadinya metabolisme pada beberapa obat salah satunya adalah deksametason. Dalam beberapa kasus, bahwa peran metabolisme usus secara kuantitatif lebih besar dari metabolisme hepatic (Wu et al., 1995; Paine et al., 1996; Holtbecker et al., 1996; Fromm et al., 1996). Dari asumsi diatas, untuk menunjukkan efek samping deksametason terhadap usus halus serta untuk mengetahui pengaruh pemberian vitamin E terhadap efek samping deksametason pada usus halus, maka penting untuk diteliti.

## METODE PENELITIAN

### Sampel Penelitian

Sampel penelitian adalah tikus putih jantan (*Rattus norvegicus*) berumur 2-3 bulan, dengan berat 100-200 gram. Jumlah sampel yang digunakan dalam penelitian ini dihitung berdasarkan rumus Federer yaitu  $(t-1)(n-1) \geq 15$ , sehingga jumlah seluruh tikus yang digunakan adalah 25

ekor. Spesimen yang digunakan adalah organ usus halus dari hewan coba yang telah diberikan perlakuan.

#### Dosis Vitamin E dan Deksametason

Penelitian ini menggunakan vitamin E dengan dosis bertingkat yaitu 100 mg/kg, 150 mg/kgbb, dan 200 mg/kgbb, sedangkan untuk dosis deksametason menggunakan dosis 0.13 mg/kgbb (Samsuri *et al.*, 2011). Kelompok perlakuan dibagi atas 5 kelompok perlakuan (P) yaitu:

P0 : Kontrol negatif.

P1 : Diberikan deksametason dengan dosis 0,13 mg/kg (kontrol positif).

P2 : Diberikan deksametason 0,13 mg/kg dan vitamin E dosis 100 mg/kgbb

P3 : Diberikan deksametason 0,13 mg/kg dan vitamin E dosis 150 mg/kgbb

P4 : Diberikan deksametason 0,13 mg/kg dan vitamin E dosis 200 mg/kgbb

#### Perlakuan sampel

Tikus dibagi ke dalam 5 kelompok perlakuan yaitu pemberian deksametason dilakukan dengan injeksi subkutan dengan dosis yang berbeda-beda sesuai dengan kelompok perlakuan, sedangkan vitamin E diberikan secara oral. Setelah 14 hari perlakuan, semua tikus dinekropsi dan diambil usus halusnya untuk selanjutnya dibuat preparat histopatologi.

#### Pembuatan Preparat Histologi dan Pewarnaan Hematoksilin-Eosin (HE)

Spesimen berupa usus halus yang diambil lalu dipotong dengan ukuran 1x1x1 cm, dan difiksasi menggunakan *Neutral Buffer Formalin* (NBF) 10%. Setelah fiksasi selesai, dilakukan proses dehidrasi dan *clearing* dengan satu sesi larutan yang terdiri dari: alkohol 70 %, alkohol 80 %, alkohol 90 %, alkohol 96 %, alkohol absolut, *toluene*, dan *parafin*, secara bertahap dalam waktu satu hari. Sampel organ diblocking dengan *embedding set* yang dituangi parafin cair kemudian didinginkan. Blok yang sudah dingin dipotong menggunakan *microtome* dengan ketebalan  $\pm 4 - 5$  mikron. Proses yang terakhir adalah pewarnaan dengan

metode Harris Hematoxylin – Eosin dan *mounting media*.

#### Variabel Pemeriksaan

Preparat histopatologi usus halus diperiksa patologisnya dibawah mikroskop masing-masing pada 5 lapang pandang. Kategori pemeriksaan histopatologi adalah sebagai berikut :

0 : Tidak ada perubahan yang teramati

1 : Ada kongesti

2 : Ada perdarahan

3 : Ada nekrosis ringan (koagulatif)

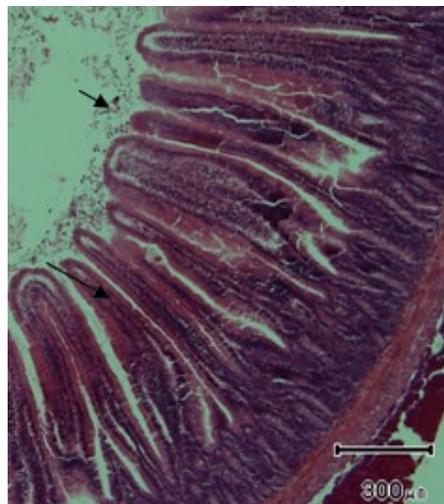
4 : Ada nekrosis berat (kaseosa)

#### Analisis Data

Untuk mengetahui perbedaan pengaruh gambaran histopatologi usus halus tikus putih pada masing-masing dosis yang diberikan, data dianalisis dengan menggunakan uji *Kruskal-Wallis* dan dilanjutkan dengan uji *Mann-Whitney* jika ada perbedaan bermakna ( $P < 0,05$ ) (Steel dan Torrie, 1991).

#### HASIL DAN PEMBAHASAN

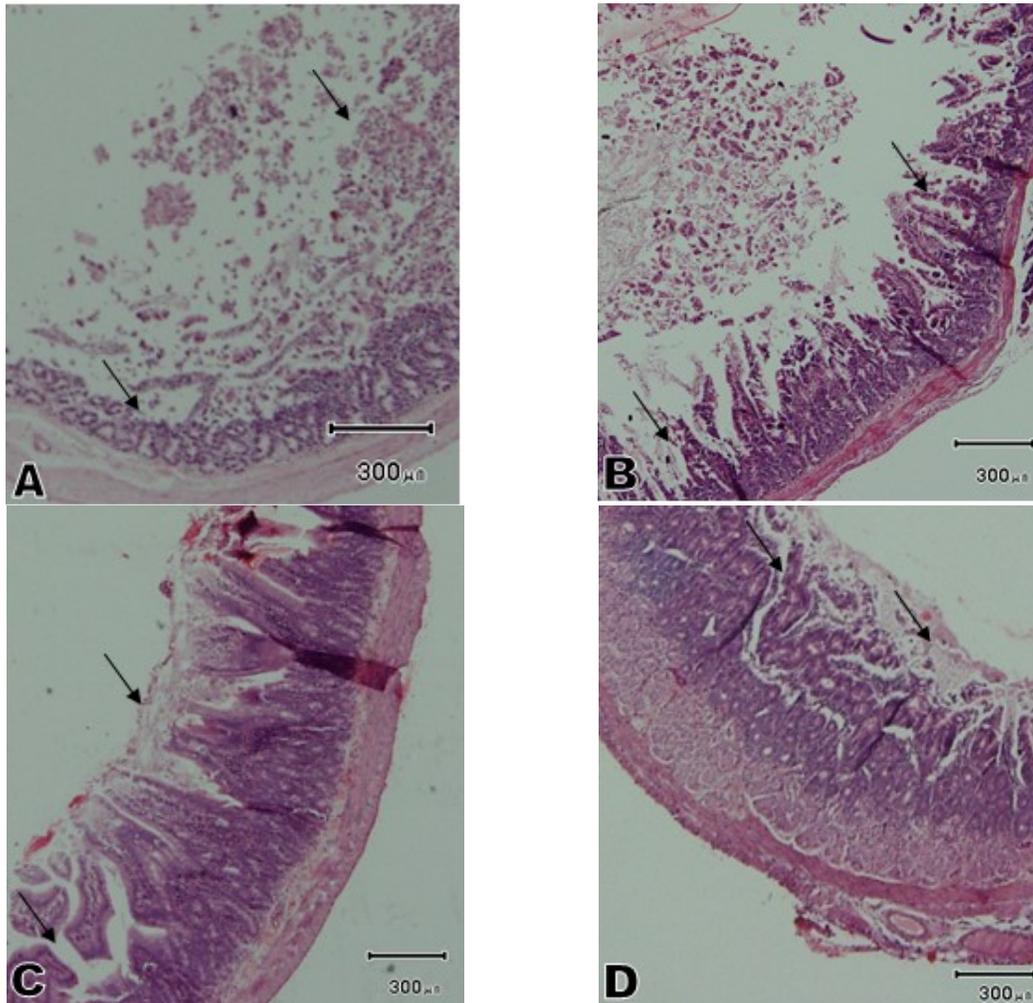
Histopatologi usus halus tikus putih pada kelompok kontrol negatif (P0) dari semua subyek sampel P0 tergolong dalam kategori skor 0 yang menunjukkan tidak ada perubahan.



Gambar 1. Histopatologi usus halus tikus putih kontrol negatif. Tampak vili masih utuh, terdapat mukus dan tidak ada kongesti, perdarahan ataupun nekrosis. (HE, 100 x).

Tidak adanya perubahan pada kelompok P0 ditunjukkan dengan keadaan vili tersusun atas kumpulan sel epitel silindris

dan mukus yang normal dari usus halus tikus putih (Gambar 1).



Gambar 2. Histopatologi usus halus tikus putih kontrol positif (P1), tampak struktur vili mengalami nekrosis berat (A). Pada kontrol positif (P2), pada bagian vili yang sedikit mengalami perbaikan vili usus (B), dan kontrol positif (P3) tampak ada mengalami perbaikan vili usus dengan sedikit mukosa usus. Sedangkan kontrol positif (P4) tampak struktur vili mukosa usus dilapisi mukus yang menandakan keadaan mendekati normal (D). (Hematoxilin-eosin, 100 x).

Histopatologi pada kontrol positif (P1) ditemukan adanya nekrosis dengan intensitas berat pada vili dari usus halus tikus putih (Gambar 2A). Kontrol positif (P2) telah mengalami sedikit perbaikan pada vili usus halus tikus putih meskipun perdarahan dan nekrosis berat masih ditemukan (Gambar 2B). Kontrol positif (P3), telah mengalami perbaikan pada vili usus halus tikus putih (Gambar 2. C). Kontrol positif (P4), telah mengalami

perbaikan pada vili usus halus tikus putih, serta terbentuknya mukus meskipun nekrosis ringan masih ditemukan (Gambar 2D).

Pada studi ini membuktikan bahwa deksametason memiliki efek samping yang kuat pada usus halus tikus putih dengan mengalami kerusakan yang berat atau terjadi nekrosis. Nekrosis pada usus halus tikus putih terjadi akibat efek samping pemberian deksametason. Deksametason

merupakan glukokortikoid sintetik dengan aktivitas anti-inflamasi kuat yang memiliki kemampuan untuk menstabilkan membran lisosom (Gyuton dan Hall, 2000). Studi sebelumnya menjelaskan, bahwa pemberian deksametason pada tikus putih juga menyebabkan kerusakan pada tubulus ginjal, hati, dan pankreas (Ridho, 2010; Insani *et al.*, 2015; Dharma *et al.*, 2015).

Secara deskriptif perbandingan histopatologi dari sampel kontrol negatif (P0) dan kontrol positif (P1) menunjukkan gambaran yang sangat bertolak belakang dengan P0 tampak vili mukosa usus yang dilapisi mukus yang utuh di sepanjang jaringan, sedangkan pada P1 menunjukkan kerusakan berat pada semua vili usus halus. Histopatologi usus halus tikus putih secara keseluruhan di semua kelompok perlakuan tersaji pada Tabel 1.

Tabel 1. Hasil pemeriksaan histopatologi usus halus berdasarkan kelompok perlakuan.

Perlakuan	Kategori Tingkat Patologis (n=25)				
	N	K	P	NR	NB
P0	5	-	-	-	-
P1	-	-	-	-	5
P2	-	-	1	3	1
P3	-	2	-	2	1
P4	-	2	1	2	-

Keterangan :

(-) : Tidak ditemukan perubahan

N : Normal

K : Kongesti

P : Perdarahan

NR: Nekrosis ringan

NB: Nekrosis berat

Rerata kerusakan usus halus tikus putih pada kelompok kontrol negatif (P0), kontrol positif (P1), dan perlakuan (P2, P3, dan P4) tersaji pada Tabel 2. Rerata kerusakan usus halus P1 adalah paling besar yaitu  $4.00 \pm 0.000$ . Rerata kerusakan usus halus tikus putih pada perlakuan P2 yaitu  $3.00 \pm 0.707$ , P3 yaitu  $2.40 \pm 1.342$ , dan P4 yaitu  $2.00 \pm 1.000$ .

Tabel 2. Rerata nilai kerusakan usus halus tikus putih

Perlakuan	N	Mean	Std. Dev
P0	5	0.00	0.000
P1	5	4.00	0.000
P2	5	3.00	0.707
P3	5	2.40	1.342
P4	5	2.00	1.000

Data diketahui jika pada kelompok perlakuan P4 mengalami kerusakan terkecil sehingga menunjukkan adanya perbaikan yang cukup besar terhadap kerusakan kontrol positif dan paling mendekati normal atau rerata kontrol negatif. Ditunjang dengan uji Kruskal-Wallis juga menunjukkan bahwa perlakuan P4 yaitu tikus putih yang diberikan injeksi deksametason secara subkutan dengan dosis 0,13 mg/kgbb dan vitamin E per oral dengan dosis 200 mg/kgbb menunjukkan gambaran histopatologi yang mendekati normal. Hal ini ditunjang dengan data (Tabel 3), bahwa pada P4 memiliki mean rank (11.1) yang menunjukkan hasil yang paling mendekati dengan perlakuan kontrol negatif (P0) yaitu *mean rank* (3.0).

Tabel 3. Rerata skoring setiap perlakuan

Perlakuan	N	Mean Rank
P0	5	3.00
P1	5	22.00
P2	5	15.50
P3	5	13.40
P4	5	11.10

Berdasarkan uji Kruskal-Wallis, terlihat bahwa terdapat perbedaan yang sangat nyata ( $P < 0,01$ ) diantara lima perlakuan diatas. Pada uji *Mann-Whithney* menunjukkan perbedaan nyata ( $P < 0,05$ ) antara perlakuan kontrol positif (P1) dengan P2 dan P3, sedangkan dengan perlakuan P4 menunjukkan berbeda sangat nyata ( $P < 0,01$ ).

Hasil penelitian ini membuktikan bahwa pemberian vitamin E terhadap efek samping deksametason pada usus halus tikus putih menunjukkan perbaikan pada setiap perlakuan yaitu P2, P3, dan P4. Pada perlakuan kontrol positif (P1), yang

diberi deksametason dengan dosis 0,13 mg/kgbb, terjadi kerusakan vili yang sangat berat. Kerusakan usus halus yang terjadi adalah nekrosis dengan intensitas berat, dimana vili dan mukus dari usus halus secara keseluruhan terjadi nekrosis.

Deksametason dengan dosis 0,13 mg/kgbb jika diberikan secara subkutan dapat meningkatkan kadar insulin serum dan menurunkan kadar glukosa serum secara signifikan (Samsuri *et al.*, 2011). Dijelaskan pula bahwa obat golongan kortikosteroid sintesis khususnya deksametason menyebabkan terjadinya stres oksidatif pada sel (Hegardt, 2003; Renner, 2002; Renner, 2003; Tome, 2004; Tonomura, 2003).

Stres oksidatif pada sel dapat terjadi akibat banyaknya akumulasi radikal bebas endogen karena pemberian deksametason secara berkala. Pada dasarnya radikal bebas endogen merupakan radikal bebas yang terbentuk sebagai respon normal dari peristiwa biokimia di dalam tubuh secara kontinu. Peristiwa biokimia tersebut meliputi reaksi reduksi-oksidasi normal di dalam mitokondria maupun peroksisom, dan metabolisme obat-obatan (Halliwell dan Gutteridge, 1992). Tetapi jika jumlah radikal bebas terlalu banyak akibat pemberian deksametason, maka antioksidan endogen tidak akan mampu menetralsirnya. Kekurangan antioksidan menyebabkan stres oksidatif yang berujung pada kerusakan sel dan menyebabkan timbulnya berbagai macam penyakit degeneratif (Evans *et al.*, 2004).

Pada hasil masing-masing perlakuan yaitu P2, P3, dan P4 menunjukkan perbaikan pada usus halus tikus putih yang diberikan deksametason 0,13 mg/kgbb dan dikombinasi dengan vitamin E dosis bertingkat yaitu P2 (100 mg/kgbb), P3 (150 mg/kgbb), dan P4 (200 mg/kgbb). Hasil tersebut menunjukkan bahwa vitamin E memiliki peran yang sangat penting mengurangi efek samping pemberian deksametason. Pada studi sebelumnya, diperoleh hasil yang sama bahwa vitamin E berpengaruh terhadap

perbaikan kerusakan hati dan pankreas hewan coba tikus putih (Insani, 2014; Dharma *et al.*, 2015). Hal ini dapat terjadi karena, vitamin E telah diketahui memiliki peran penting sebagai senyawa antioksidan yang larut dalam lemak (Bridelius-Flohe, 1999).

Pada penelitian ini didapatkan hasil, bahwa pemberian vitamin E per oral pada tikus putih yang diberikan deksametason subkutan mengalami perbaikan yang sangat signifikan pada organ usus halus, khususnya dosis vitamin E 200 mg/kg. Perbaikan terlihat cukup baik, dimana vili dari usus halus hanya sebagian yang mengalami nekrosis, serta adanya lapisan mukus di setiap bagian dari vili usus halus. Akan tetapi masih dijumpai adanya nekrosis ringan dari usus halus tikus putih akibat efek dari pemberian deksametason. Pada dosis vitamin E 100 mg/kg dan 150 mg/kg juga telah mengalami perbaikan yang cukup dimana vili usus halus sebagian masih tampak, akan tetapi nekrosis ringan hingga berat masih terjadi.

## SIMPULAN DAN SARAN

### Simpulan

Pemberian deksametason 0,13 mg/kg berpengaruh terhadap histopatologi usus yaitu adanya lesi kongesti, perdarahan, dan nekrosis. Pemberian vitamin E dapat memperbaiki histologi usus halus tikus putih, dimana pada dosis 200 mg/kg lebih baik efeknya daripada dosis 100 mg/kg dan 150 mg/kg.

### Saran

Perlu dilakukan kajian lebih lanjut dari berbagai disiplin ilmu terkait pemanfaatan vitamin E untuk mengurangi efek samping penggunaan deksametason jangka panjang.

## UCAPAN TERIMAKASIH

Penulis mengucapkan terimakasih kepada Bapak Kepala Balai Besar Veteriner Denpasar yang telah mengizinkan menggunakan beberapa fasilitas selama penelitian ini berlangsung.

## DAFTAR PUSTAKA

- Dharma IGBS, Berata IK, Samsuri. 2015. Studi histopatologi pankreas tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang diberi deksametason dan suplementasi Vitamin E. *Indon Med Vet* 4(3): 257-266.
- Fromm MF, Busse D, Kroemer HK, Eichelbaum M. 1996. Differential induction of prehepatic and hepatic metabolism of verapamil by rifampin. *Hepatology* 24: 796-801.
- Guyton AC, Hall JE. 2000. Textbook of Medical Physiology. 10<sup>th</sup> Ed. Philadelphia, WB Saunders Company. Pp: 875-879.
- Halliwell B, Gutteridge JMC. 1999. Free radicals in biology and medicine. third edition. New York: Oxford Univ Pr Inc.
- Holtbecker N, Fromm MF, Kroemer HK, Ohnhms EF, Heidemann H. 1996. The nifedipinerifampin interaction: Evidence for induction of gut wall metabolism. *Drug Metab Dispos* 24: 1121-1123.
- Indranarum T, Marowardoyo S. 2003. Kadar plasma kortisol pada beberapa macam manifestasi efek samping kortikosteroid pada kulit. *J Berkala Ilmu Penyakit Kulit dan Kelamin* 15.
- Insani A, Samsuri, Berata IK. 2015. Gambaran Histopatologi Hati Tikus Putih yang Diberikan Deksametason dan Vitamin E. *Indon Med Vet* 4(3): 228-237.
- Katzung GB. 2002. Farmakologi dasar dan klinik. Penerjemah dan editor: Bagian Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga. Ed 8. Jakarta: Salemba Medika, pp: 582-590.
- Krishna DR, Klotz U. 1994. Extrahepatic metabolism of drugs in humans. *Clin Pharmacokinet* 26: 144-160.
- Kusumaadhi ZM. 2010. Pengaruh pemberian deksametason dosis bertingkat per oral 30 hari terhadap kerusakan mukosa lambung tikus Wistar. Universitas Diponegoro.
- Lin JH, Chiba M, Baillie TA. 1999. Is the role of the small intestine in first-pass metabolism overemphasized. *Pharmacol Rev* 51: 135-158.
- Paine MF, Shen DD, Kunze KL, Persins JD, Marsh CL, McVicar JP, Barr DM, Gillies BS, Thummel KE. 1996. First-pass metabolism of midazolam by the human intestine. *Clin Pharmacol Ther* 60: 14-24.
- Renwick AG, George CF. 1989. Metabolism of xenobiotics in the gastrointestinal tract, in intermediary xenobiotic metabolism in animals: methodology, mechanisms and significance. Taylor & Francis, London, pp: 13-40.
- Ranta F, Avram D, Berchtolf S, Dufer M, Drews G, Lang F, Ullrich S. 2006. Dexamethasone induces cell death in insulin-secreting cells, an effect reversed by exendin-4. USA. American Diabetes Association.
- Ridho MR. 2010. Pengaruh pemberian deksametason dosis bertingkat per oral 30 hari terhadap kerusakan tubulus ginjal tikus Wistar. Fakultas Kedokteran. Universitas Diponegoro.
- Samsuri, Rahardjo, Sudjarwo. 2011. The influences of dexamethasone sodium phosphate to insulin and glucose level in young male rats body (*Rattus norvegicus*). Asosiasi Farmakologi dan Farmasi Veteriner Indonesia.
- Sativani I. 2010. Pengaruh pemberian deksametason dosis bertingkat per oral 30 hari terhadap kerusakan sel hepar tikus Wistar. Fakultas Kedokteran. Universitas Diponegoro.
- Stell RGD, Torrie JH. 1991. Principles and Procedures of Statistic. A Biomedical Approach. Second Edition. Tokyo: Mc. Grow Hill.
- Wu CY, Benet LZ, Hebert MF, Gupta SK, Rowland M, Gomez DY, Wachter VJ. 1995. Differentiation of absorption and first-pass gut and hepatic metabolism in humans: Studies with cyclosporine. *Clin Pharmacol Ther* 58:492-497.