

# STRUKTUR MIKROSKOPIS KARTILAGO EPIFISIALIS TIBIA FETUS MENCIT (*Mus musculus* L.) DARI INDUK DENGAN PERLAKUAN KAFEIN

Heri Budi Santoso\*

\*Program Studi Biologi FMIPA UNLAM  
Jl. A. Yani Km 36 Banjarbaru Kalimantan Selatan

## ABSTRACT

*Caffeine affects activity of enzyme of polimerase DNA, induce the mitosis of cells mammal of before replication DNA ended the perfection, and also pursue the activity of enzyme fosfodiesterase is hence anticipated by a potential caffeine generate the developmental defect, for example can pursue the process of ossification endochondralis in growth plate. This present research studied the effect of caffeine gift by oral on pregnant dam during organogenesis to structure of histologi growth plate tibia foetus. Twenty four pregnant mice (6 per group) were treated by gavage with 0 (control), 40, 80, 120 mg/kg b.w caffeine from gestation day 6 to 15. On day 18 of pregnancy, fetuses was removed from dams by caecarean section.. Observation of histological structure of the tibial growth plate preparation by paraffin method (Hematoxylin-Eosin staining). The result showed that caffeine cause slightened proliferative zone, maturation zone, and cartilage calcification zone on the mouse tibial growth plate.*

**Key words:** *caffeine; the mouse tibial growth plate, ossification endochondralis*

## PENGANTAR

Sejak ditemukannya tiga kasus cacat pada bayi di Amerika Serikat, yaitu ekstrodaктиli dari ibu yang mengkonsumsi kopi antara 19–30 mg/kgbb/hari selama kehamilannya, maka semakin kuat kecurigaan efek teratogenik kafein pada manusia (Jacobson *et al.*, 1981). Semenjak itu, penelitian tentang efek teratogenik kafein merupakan bahan penelitian yang menarik.

Penelitian yang pernah dilakukan pada mencit, kafein terbukti menyebabkan cacat pada fetus antara lain berupa ekstrodaктиli, celah langit-langit mulut, dan hematoma (Kawana *et al.*, 1988). Beck dan Urbano (1991), Wijayanto (1996), Santoso dan Sanyoto (2000) melaporkan bahwa pada mencit dan tikus kafein menyebabkan penurunan berat fetus, gangguan pertumbuhan skeleton dan penundaan kalsifikasi. Kalsifikasi adalah proses penimbunan kalsium ke suatu matriks.

Dalam penelitian ini akan dikaji efek teratogenik kafein terhadap gangguan pertumbuhan skeleton, tetapi ditinjau secara histologis, dengan kartilago epifisialis tibia sebagai modelnya. Hasil penelitian ini diharapkan dapat diketahui gambaran/struktur histologis dari gangguan pertumbuhan skeleton yang selama ini belum pernah dilakukan oleh peneliti sebelumnya.

Menurut Ham dan Cormack (1979), kartilago epifisialis adalah jaringan kartilago yang terdapat di perbatasan epifisis dan diafisis tulang. Pada jaringan kartilago ini terjadi proses osifikasi endokondralis yang akan menggantikan kartilago epifisialis menjadi tulang. Di dalam kartilago ini terjadi beberapa proses yang mendasari pertumbuhan tulang ke

arah panjang tulang. Dalam kaitannya dengan pertumbuhan tulang, kartilago epifisialis dibagi dalam zona-zona, yaitu zona cadangan kondrosit, zona proliferasi, zona maturasi, dan zona kartilago yang mengalami mineralisasi. Sebagai akibat proliferasi sel-sel kondrosit dalam zona proliferasi dan pematangan kondrosit dalam zona maturasi, kartilago epifisialis bergeser dan meluas ke arah sumbu panjang tulang, sehingga terjadi pertumbuhan tulang ke arah panjang tulang.

Beck dan Urbano (1991) menyatakan bahwa kafein mampu mengintervensi mitosis yaitu memiliki kemampuan menurunkan aktivitas enzim polimerase DNA, menginduksi mitosis pada sel-sel mamal sebelum replikasi DNA berakhir pada fase sintesis (fase S), dan menghambat aktivitas enzim fosfodiesterase. Dengan demikian maka diduga kafein dapat menghambat proses osifikasi endokondralis dalam kartilago epifisialis.

Penelitian ini bertujuan untuk mengkaji efek pemberian kafein secara oral pada induk mencit selama masa organogenesis terhadap gambaran/struktur mikroskopis kartilago epifisialis tibia fetus.

## BAHAN DAN CARA KERJA

Penelitian ini dilakukan dengan pola Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan empat perlakuan dan 6 (enam) kali perulangan per perlakuan.

Hewan yang digunakan dalam penelitian ini adalah 24 ekor mencit betina galur DDY yang diperoleh dari Unit Pengembangan Hewan Percobaan (UPHP) UGM Yogyakarta dengan berat badan rata-rata 30 g, umur 3 bulan,

dan belum pernah bunting. Sebelum penelitian dimulai, hewan uji diadaptasikan selama dua minggu dalam kandang pada suhu kamar (20–25 °C) dan fotoperiode 13/11 jam siklus gelap-terang. Pemeriksaan siklus estrus dilakukan selama 2 kali siklus dengan cara membuat preparat apus vagina.

Setelah mendapatkan mencit yang memiliki siklus reguler sebanyak 24 ekor, dilakukan pembagian secara acak menjadi 4 kelompok, masing-masing 6 ekor mencit tiap kelompok. Mencit yang telah mengalami estrus dikandangkan bersama-sama dengan mencit jantan. masing-masing satu mencit jantan pada tiap satu kelompok mencit betina. Mencit jantan dan mencit betina dicampur pada sore hari dan apabila pada keesokan harinya ditemukan sumbat vagina dan atau sperma di dalam vagina maka pada keesokan harinya ditentukan sebagai kebuntingan hari ke-1 (Kaufman, 1992).

Penentuan dosis kafein dalam penelitian ini berdasarkan hasil konversi dosis maksimal yang digunakan oleh manusia ke mencit mengikuti tabel konversi perhitungan dosis antar jenis hewan menurut cara Laurence dan Bacharach (1964), dalam Ngatijan 1991.

Konsumsi kafein pada manusia menurut Asthon (1987) adalah 200–2000 mg kafein/hari. Pada penelitian ini dosis kafein dibatasi antara 300–950 mg/hari. Angka konversi dosis dari manusia 70 kg ke mencit 20 g = 0,0026. Berdasarkan angka konversi diperoleh dosis minimal kafein untuk mencit 20 g =  $0,0026 \times 300 \text{ mg} = 0,78 \text{ mg}/20 \text{ gbb/hari}$ .

Berdasarkan dosis minimal untuk tiap kg bb mencit ditentukan dosis perlakuan, yaitu 40 mg kafein/kg bb/hari, 80 mg kafein/kg bb/hari, dan 120 mg kafein/kg bb/hari. Berat mencit yang digunakan adalah berat pada kebuntingan hari ke-6. Berdasarkan angka konversi tersebut diperoleh dosis 300–950 mg/kafein/hari manusia, dan 40–120 mg kafein/hari untuk mencit.

Dua puluh empat ekor mencit betina bunting dibagi dalam empat kelompok secara acak, masing-masing kelompok sebanyak 6 ekor.

Kelompok I (kontrol) diberi 0,5 ml akuades

Kelompok II diberi 40 mg kafein/kgbb/hari dalam 0,5 ml akuades

Kelompok III diberi 80 mg kafein/kgbb/hari dalam 0,5 ml akuades

Kelompok IV diberi 120 mg kafein/kgbb/hari dalam 0,5 ml akuades

Perlakuan diberikan selama 10 hari, yaitu mulai kebuntingan hari ke-6 sampai dengan kebuntingan hari ke-15 (masa organogenesis). Pemberian perlakuan dilakukan secara oral dengan menggunakan spuit injeksi 1 ml yang

ujungnya dilengkapi kanul. Penimbangan berat badan dilakukan setiap hari.

Pengamatan fetus dilakukan pada kebuntingan hari ke-18 dengan cara pembedahan pada bagian perut untuk mengeluarkan fetus dari uterus. Pengamatan dilakukan terhadap gambaran histologis kartilago epifisialis tibia mencit dengan cara: tibia fetus dari tungkai belakang sebelah kanan diambil secara amputasi dengan pisau yang tajam, kemudian secara berurutan preparat difiksasi dengan larutan formalin 10% selama 24 jam, dehidrasi dengan alkohol 70% hingga alkohol absolut, penjernihan dengan toluol, infiltrasi dan penanaman dalam paraffin, dibuat sediaan metode paraffin, diiris setebal 6  $\mu\text{l}$ , kemudian diwarnai dengan Hematoksilin-Eosin (Mc Manus dan Mowry, 1960).

Pengamatan terhadap sediaan penampang membujur kartilago epifisialis tibia fetus meliputi zona cadangan kondrosit, zona proliferasi, zona maturasi, dan zona kartilago yang mengalami mineralisasi. Dari setiap sediaan diambil secara random 5 lajur yang paling jelas gambaran kondrositnya pada masing-masing zona, kemudian diukur tebal lapisan sel pada masing-masing zona dengan mikrometer. Selain itu, struktur kondrosit diamati secara deskriptif terhadap ada tidaknya kerusakan berupa nekrosis pada masing-masing zona.

Pembuatan dan pengamatan preparat histologis kartilago epifisialis dilakukan di Laboratorium Histologi Fakultas Kedokteran Unlam Banjarbaru.

Data hasil penelitian yaitu rerata tebal lapisan setiap zona dalam kartilago epifisialis tibia fetus dianalisis dengan ANOVA pola searah dan dilanjutkan dengan Duncan's *Multiple Range Test*. Data kerusakan kondrosit dan jaringan kartilago epifisialis tibia fetus dianalisis secara deskriptif kualitatif dan dipotret.

## HASIL

Kartilago epifisialis tibia fetus dalam penelitian ini diambil sebagai wakil terhadap pengamatan osteogenesis endokondralis tulang panjang.

### Zona cadangan kondrosit

Hasil pengamatan tebal lapisan kondrosit kelompok kontrol dan kelompok perlakuan menunjukkan adanya kartilago hialin yang terdiri dari kondrosit yang berbentuk bundar atau ovoid. Kondrosit dalam zona ini berada dalam keadaan istirahat dan tidak mengalami perubahan morfologi.

Hasil pengamatan tebal lapisan kondrosit pada zona cadangan kondrosit kartilago epifisialis tibia tertantum pada Tabel 1.

**Tabel 1.** Rerata ketebalan zona cadangan kondrosit kartilago epifisialis tibia fetus mencit dari induk yang diberi kafein selama masa organogenesis.

Kelompok	Dosis (mg/kg bb/hari)	Ketebalan zona cadangan kondrosit ( $\mu\text{m}$ )	Panjang keseluruhan tibia ( $\mu\text{m}$ )
I	0	457,33 <sup>a</sup>	7360 <sup>a</sup>
II	40	456,67 <sup>a</sup>	7300 <sup>a</sup>
III	80	456,17 <sup>a</sup>	7154 <sup>b</sup>
IV	120	455,95 <sup>a</sup>	7008 <sup>c</sup>

Huruf berbeda dalam satu kolom menunjukkan perbedaan bermakna

Analisis statistik dengan ANOVA menunjukkan perbedaan yang tidak bermakna ( $p > 0,05$ ) antara ketebalan zona cadangan kondrosit kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan.

### Zona Proliferasi

Hasil pengamatan pada zona proliferasi kelompok kontrol menunjukkan adanya kondrosit yang membelah diri secara mitosis menjadi banyak, sel-selnya gepeng dan saling berdekatan, dan membentuk deretan kumpulan-kumpulan sel yang sejajar dengan sumbu panjang tulang. Hasil pengamatan tebal lapisan kondrosit pada zona proliferasi dapat dilihat pada Tabel 2.

**Tabel 2.** Rerata ketebalan zona proliferasi kartilago epifisialis tibia fetus mencit dari induk yang diberi kafein selama masa organogenesis

Kelompok	Dosis (mg/kg bb/hari)	Ketebalan zona proliferasi ( $\mu\text{m}$ )	Panjang keseluruhan tibia ( $\mu\text{m}$ ) <sup>I</sup>
I	0	722,72 <sup>a</sup>	7360 <sup>a</sup>
II	40	719,60 <sup>a</sup>	7300 <sup>a</sup>
IV	60	662,83 <sup>b</sup>	7154 <sup>b</sup>
	120	642,67 <sup>b</sup>	7008 <sup>c</sup>

Huruf berbeda dalam satu kolom menunjukkan perbedaan bermakna

Analisis statistik dengan ANOVA menunjukkan adanya perbedaan yang bermakna antarperlakuan. Uji lanjutan antarkelompok perlakuan dengan uji DMRT menunjukkan perbedaan bermakna ( $p < 0,05$ ) antara kelompok perlakuan IV dengan kelompok perlakuan II dan kelompok perlakuan I; dan antara kelompok perlakuan III dengan kelompok perlakuan II dan kelompok perlakuan I. Sedangkan antara kelompok perlakuan IV dan kelompok perlakuan III serta antara kelompok perlakuan II dan kelompok perlakuan I berbeda tidak nyata.

### Zona Maturasi

Hasil pengamatan pada zona maturasi kelompok kontrol dan kelompok perlakuan menunjukkan adanya kondrosit yang hipertrofi dan bervakuola. Hasil pengamatan tebal zona maturasi antarkelompok tercantum pada Tabel 3.

**Tabel 3.** Rerata ketebalan zona maturasi kartilago epifisialis tibia fetus mencit dari induk yang diberi kafein selama masa organogenesis

Kelompok	Dosis (mg/kg bb/hari)	Ketebalan zona maturasi ( $\mu\text{m}$ )	Panjang keseluruhan tibia ( $\mu\text{m}$ )
I	0	290,08 <sup>a</sup>	7360 <sup>a</sup>
II	40	289,98 <sup>a</sup>	7300 <sup>a</sup>
III	80	216,75 <sup>b</sup>	7154 <sup>b</sup>
IV	120	171,10 <sup>c</sup>	7008 <sup>c</sup>

Huruf berbeda dalam satu kolom menunjukkan perbedaan bermakna

Analisis statistik dengan ANOVA menunjukkan ada perbedaan yang bermakna ( $p < 0,05$ ) antara ketebalan zona maturasi kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan. Uji lanjutan dengan uji DMRT menunjukkan perbedaan bermakna ( $p < 0,05$ ) antara kelompok perlakuan IV dan kelompok perlakuan III, kelompok perlakuan II dan kelompok perlakuan I; kelompok perlakuan III dengan kelompok perlakuan II dan kelompok perlakuan I. Sedangkan antar kelompok perlakuan II dan kelompok perlakuan I berbeda tidak nyata.

### Zona kartilago yang mengalami mineralisasi

Hasil pengamatan secara mikroskopis pada zona kartilago yang mengalami mineralisasi pada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan menunjukkan adanya satu atau beberapa lapisan kondrosit yang hipertrofi dan mati. Zona ini tipis dan terletak berbatasan langsung dengan diafisis. Matriks kartilago dalam zona ini mulai mengalami kalsifikasi dengan adanya pengendapan hidroksiapatit sehingga tampak septa tipis atau sekat pembatas di sekeliling kondrosit yang hipertrofi dan mati. Hasil tersebut dapat dilihat pada Tabel 4.

Analisis statistik dengan ANOVA menunjukkan adanya perbedaan yang bermakna ( $p < 0,05$ ) antara ketebalan zona kartilago yang mengalami mineralisasi kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan. Uji lanjutan dengan DMRT menunjukkan perbedaan bermakna ( $p < 0,05$ ) antarkelompok perlakuan IV dengan kelompok perlakuan III, kelompok perlakuan II, dan kelompok perlakuan I. Perbedaan bermakna juga terjadi antara kelompok perlakuan III dengan kelompok perlakuan II dan I. Sedangkan

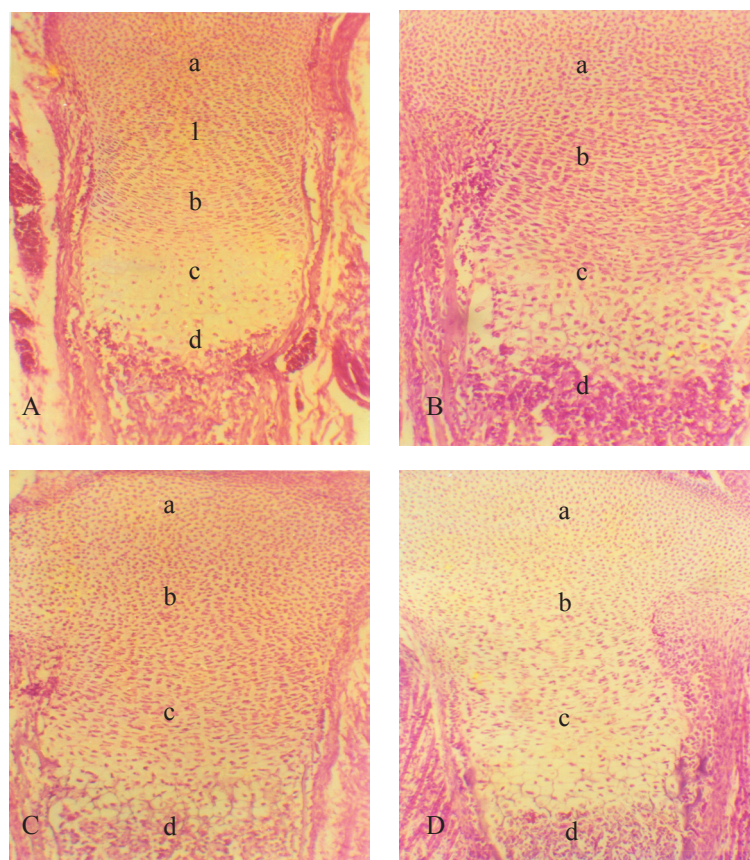
kelompok perlakuan II dan kelompok perlakuan I berbeda tidak nyata.

**Tabel 4.** Rerata ketebalan zona kartilago yang mengalami mineralisasi kartilago epifisialis tibia fetus mencit dari induk yang diberi kafein selama masa organogenesis

Kelompok	Dosis (mg/kg bb/hari)	Ketebalan Zona kartilago yang mengalami mineralisasi ( $\mu\text{m}$ )	Panjang keseluruhan Tibia ( $\mu\text{m}$ )
I	0	293,17 <sup>a</sup>	7360 <sup>a</sup>
II	40	291,75 <sup>a</sup>	7300 <sup>a</sup>
III	80	254,62 <sup>b</sup>	7154 <sup>b</sup>
IV	120	234,32 <sup>c</sup>	7008 <sup>c</sup>

Huruf berbeda dalam satu kolom menunjukkan perbedaan bermakna

Zona cadangan kondrosit, zona proliferasi, zona maturasi, dan zona kartilago yang mengalami mineralisasi kartilago epifisialis tibia fetus akibat kafein disajikan pada Gambar 1.



**Gambar 1.** Fotomikroskopi daerah ujung proksimal tibia fetus (kartilago epifisialis tibia)

A. Kelompok kontrol; B. Kelompok perlakuan II (dosis 40 mg/kgbb/hari); C. Kelompok perlakuan III (dosis 80 mg/kgbb/hari); D. Kelompok perlakuan IV (dosis 120 mg/kgbb/hari)

Keterangan:

- |   |                                     |
|---|-------------------------------------|
| a. Zona cadangan kondrosit                    | penampang : membujur                |
| b. Zona proliferasi                           | tebal irisan : $6\mu\text{m}$       |
| c. Zona maturasi                              | pewarnaan : Hematoksilin-Eosin (HE) |
| d. Zona kartilago yang mengalami mineralisasi | perbesaran : $100\times$            |

1. Kondrosit

2. Kondrosit tersusun tidak beraturan dalam masing-masing lajur, selnya saling berjauhan dan tidak membentuk deretan kumpulan sel yang sejajar dengan sumbu panjang tulang

## PEMBAHASAN

Dari hasil penelitian ini kafein mampu menghambat proses osifikasi endokondralis kartilago epifisialis tibia fetus mencit yang terlihat dengan semakin menipisnya zona proliferasi, zona maturasi, dan zona kartilago yang mengalami mineralisasi. Sedangkan ketebalan lapisan pada zona cadangan kondrosit yang sama antara kelompok kontrol dan kelompok perlakuan disebabkan karena kafein tidak memengaruhi kondrosit yang berada dalam keadaan istirahat atau tidak aktif membelah. Diduga kafein mempunyai target pada sel yang sedang aktif membelah secara mitosis. Beck dan Urbano (1991) yang menyatakan bahwa kafein mengintervensi mitosis pada sel-sel mamalia sebelum replikasi DNA berakhir sempurna pada fase sintesis (fase S), dan menghambat aktivitas enzim osfodiesterase.

Hasil pengamatan mikroskopis ketebalan zona proliferasi menunjukkan adanya penurunan ketebalan zona sejalan dengan semakin tingginya dosis kafein. Selain itu, pada kelompok perlakuan IV tampak adanya perubahan gambaran lapisan kondrosit dalam zona proliferasi. Kondrosit tampak tersusun tidak beraturan dalam masing-masing lajur. Sel-selnya saling berjauhan dan tidak membentuk deretan kumpulan-kumpulan sel yang sejajar dengan sumbu panjang tulang (Gambar 1D, 2). Diduga, hal ini disebabkan oleh kafein yang berinteraksi dengan proses pembelahan sel yaitu menghambat kecepatan mitosis, sehingga terjadi hambatan proliferasi sel. Menurut Ham dan Cormack (1979), zona ini aktif bermitosis dan berfungsi sebagai tempat pembentukan sel-sel baru untuk menggantikan sel-sel yang sudah hipertrofi dan berdegenerasi pada bagian yang berbatasan dengan diafisis. Jika kafein dapat menghambat proliferasi sel pada zona proliferasi ini maka dimungkinkan akan memengaruhi zona-zona selanjutnya dalam kartilago epifisialis tibia, sehingga dapat menghambat proses kalsifikasi tibia, yang akhirnya panjang keseluruhan tibia menjadi lebih pendek dibandingkan dengan kelompok kontrol. Howland (1975 dalam Sagi 1996) menambahkan bahwa sel embrio masih sangat rentan terhadap pengaruh dari luar karena terjadi mitosis berlanjut. Dalam keadaan bermitosis, inti sel dalam keadaan tidak berselaput dan kromosom tersebar, sehingga kafein dengan mudah berinteraksi yang akhirnya menimbulkan kerusakan pada sel, jaringan, dan menyebabkan kelainan perkembangan.

Hasil pengamatan secara mikroskopis terhadap lapisan kondrosit dalam zona maturasi menunjukkan penurunan ketebalan sejalan dengan tingginya dosis kafein. Hal ini disebabkan karena kafein menghambat kecepatan mitosis kondrosit dalam zona proliferasi sehingga zona-zona di

bawahnya akan semakin tipis ketebalannya. Menurut Ham dan Cormack (1979), kondrosit yang hipertrofi akan selalu diganti oleh kondrosit yang baru sebagai hasil proliferasi kondrosit dalam zona proliferasi. Jika proliferasi kondrosit dalam zona proliferasi dihambat oleh kafein maka secara otomatis kondrosit yang hipertrofi dalam zona maturasi juga akan semakin menipis jika dibanding kontrol.

Ham dan Cormack (1979) menambahkan bahwa kondrosit di dalam zona proliferasi dan zona maturasi memegang peranan penting dalam kalsifikasi tulang, sebab bakal tulang panjang akan bertambah panjang sebagai akibat dari proliferasi kondrosit dalam zona proliferasi dan pematangan kondrosit di dalam zona maturasi. Selain itu, ciri khas zona maturasi adalah kemampuannya menghasilkan enzim fosfatase yang sangat penting untuk kalsifikasi bahan ekstraseluler yang mengelilingi kondrosit yang hipertrofi. Lama-kelamaan kondrosit yang hipertrofi ini akan berdegenerasi dan mati serta selalu diganti yang baru sebagai hasil proliferasi kondrosit dalam zona proliferasi.

Dari data hasil penelitian secara umum dapat disimpulkan bahwa kafein yang diberikan secara oral kepada induk mencit bunting selama masa organogenesis dapat menyebabkan perubahan gambaran mikroskopis kartilago epifisialis tibia fetus, yakni menipisnya zona proliferasi, zona maturasi, dan zona kartilago yang mengalami mineralisasi. Dari hasil penelitian ini perlu dilakukan penelitian lanjutan tentang efek kafein pada struktur histologis kartilago epifisialis dengan pengamatan *scanning electron microscope* (SEM) dan studi histokimiawi deteksi kalsium dan hidroksiapatit secara komprehensif.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih saya ucapkan kepada Bagian Proyek Peningkatan Kualitas SDM Ditjen Dikti Depdiknas sebagai penyedia dana sehingga penelitian ini selesai dan kepada dr. M. Ali Faisal yang telah membantu penelitian ini.

## KEPUSTAKAAN

- Beck SL dan Urbano CM, 1991. Potentiating Effect of Caffeine on the Teratogenicity of Acetazolamide in C57BL/6J mice. *Teratology* 44: 241–250.
- Jacobson MF, Goldman AS, dan Syme RH, 1981. Coffee and Birth Defects. *The Lancet*, June 27.
- Ham AW dan Cormack DH, 1979. *Histology*. 8<sup>th</sup> ed. J.B. Lippincot Company, Philadelphia.
- Kaufmann MH, 1992. *The Atlas of Mouse Development*. Academic Press Limited, London.
- Kawana K, Fujii T, dan Toyonaga K, 1988. Synergistic effect of caffeine & calcium entry blockers in induction of cleft palate in mice. *Twenty-eighth Annual Meeting of the*

- Japanese Teratology Society & the Second Meeting of the International Federation of Teratology Societies*, July 14–16 Kyoto Japan: 238.
- McManus JFA dan Mowry RW, 1960. Staining Methods. Histologic and Histochemicals. Paul B. Hoeber, Inc.
- Ngatijan, 1991. Metode Laboratorium dalam Toksikologi. Petunjuk Laboratorium, PAU Bioteknologi UGM, Yogyakarta.
- Sagi M, 1996. Pengaruh Buprofezin terhadap perkembangan embrio dan anak ayam (*Gallus gallus*) dengan pendekatan in ovo, in vitro, dan in vivo. *Disertasi* (tidak dipublikasikan). Program Pascasarjana UGM, Yogyakarta.
- Santoso HB dan Sanyoto DD, 2000. Efek kafein pada masa organogenesis terhadap biometrika dan gambaran morfologi fetus mencit. *Laporan Penelitian*. Lembaga Penelitian Unlam, Banjarmasin.
- Wijayanto H, 1996. Pengaruh kafein pada masa organogenesis terhadap gambaran morfologi skeleton fetus tikus putih. *Tesis* (tidak dipublikasikan). Program Pascasarjana UGM, Yogyakarta.