

# VARIASI DOSIS SUPLEMENTASI SENG TERHADAP KERUSAKAN EPITEL TUBULUS GINJAL PADA TIKUS YANG TERPAJAN ALUMINIUM

Budi Santosa\*

\* *Analisis Kesehatan Fakultas Keperawatan dan Kesehatan Unimus. Hp:081805867211, e-mail: budi-unimus@yahoo.co.id*

## ABSTRACT

Logam berat termasuk tawas yang mengandung Aluminium (Al) berdampak pada kerusakan organ ginjal. Suplementasi seng dapat meningkatkan protein "metalotionein" yang dapat mengikat Al. Penelitian ini bertujuan untuk membuktikan pengaruh suplementasi seng 0,2 mg, 0,4 mg, 0,8 mg terhadap hambatan kerusakan sel epitel tubulus ginjal akibat pemberian tawas dalam pakan pada tikus putih *Rattus norvegicus*.

Desain penelitian "Randomized Control-Group Only Design", 28 tikus dibagi 4 kelompok yaitu 1 kelompok kontrol dan 3 kelompok perlakuan. Pada kelompok kontrol dan perlakuan dipajani Al 0,8 gr dalam pakan dan kelompok perlakuan disuplementasi seng 0,2; 0,4; 0,8 setiap hari melalui sonde sampai minggu ke-4. Hari terakhir minggu ke-4 diperiksa degenerasi dan nekrosis epitel tubulus ginjal, dilakukan uji *one way anova* untuk mengetahui perbedaan antar perlakuan.

Tidak terdapat perbedaan suplemen seng 0,2 mg, 0,4 mg dan 0,8 mg terhadap degenerasi sel epitel tubulus ginjal dan terdapat perbedaan bermakna terhadap sel nekrosis.

Pemberian suplementasi seng 0,2 mg, 0,4 mg dan 0,8 mg berpengaruh terhadap jumlah nekrosis sel epitel tubulus ginjal

**Kata kunci :** Tawas, Seng, tubulus ginjal

## PENDAHULUAN

Tawas merupakan bahan koagulan yang paling banyak digunakan karena bahan ini paling ekonomis, mudah diperoleh di pasaran serta mudah penyimpanannya. Biasanya tawas dipakai untuk menjernihkan air, mengawetkan makanan termasuk menjadikan tekstur makanan menjadi lebih baik (putih dan kenyal).<sup>1,2</sup>

Jumlah pemakaian tawas tergantung dari kebutuhan, misalnya untuk menjernihkan air dengan melihat kekeruhan air baku. Semakin keruh air jumlah tawas yang dibutuhkan semakin besar. Untuk mengawetkan makanan misalnya ikan, hasil penelitian yang dilakukan oleh Nurrahman dan Isworo, membuktikan bahwa ikan tongkol yang direndam dalam larutan tawas sebelum diasap, teksturnya menjadi lebih kompak, kesat dan keras. Ikan yang direndam terlebih dahulu pada larutan tawas 10% selama 1 jam sebelum diasap, warnanya lebih putih, konsentrasi senyawa nitrogen volatilnya menurun sehingga mengurangi bau amis dan rasa pahit, dan tidak berkurang kadar proteinnya. Adanya interaksi dengan tawas, maka nilai total volatil nitrogen yang berkaitan dengan bau amis ikan akan menurun.<sup>1</sup>

Aluminium (Al) merupakan unsur yang terdapat dalam senyawa tawas dan termasuk salah satu macam logam berat. Logam berat dalam bentuk ion sangat toksik dapat menyebabkan kerusakan organ detoksifikasi yaitu hati dan ginjal. Logam berat menyebabkan nekrosis sel-sel epitel tubulus ginjal, permeabilitas membrana glomerulus meningkat, sehingga protein dan zat-zat yang terlarut dalam plasma mudah melewatinya. Menurut Haribi dkk, suplementasi tawas dalam pakan dengan konsentrasi 2%, 3%, 4%, 5% selama paparan 4,6 dan 8 minggu pada mencit mengakibatkan kerusakan jaringan pada organ hati dan ginjal. Logam berat dalam jaringan berikatan dengan protein pengikat logam yaitu "metalotionin" pada gugus sulfidril dari protein tersebut.<sup>3</sup> "Metalotionin" dapat disintesis di hati maupun dinding saluran cerna melalui absorpsi seng dalam jumlah yang tinggi.<sup>4</sup>

Absorpsi seng dari makanan yang dikonsumsi atau suplementasi berkisar antara 15-60%. Dosis seng antara 5-20 mg per hari banyak diberikan pada penelitian tentang efek seng terhadap pertumbuhan. Pada percobaan meta analisis suplementasi yang diberikan berkisar antara 1,5-50 mg per hari. Dengan pertimbangan bahwa "efficacy" absorpsi seng adalah 60% untuk 5 mg, 50% untuk 10 mg dan 40% untuk 15 mg<sup>5</sup>. Suplementasi seng secara bertingkat untuk melihat tingkat efektifitas dosis perlu dipertimbangkan misalnya 10 mg per hari, 20 mg per hari dan 40 mg per hari. Dosis ini dapat dikonversi pada hewan coba apabila penelitian dilakukan pada

hewan percobaan. Kelebihan seng akibat absorpsi dapat disimpan di hati dalam bentuk "metalotionin", sebagian ke pankreas dan jaringan tubuh yang lain seperti rambut dan kulit. Absorpsi seng diatur oleh metalotionin yang disintesis di dalam sel dinding saluran cerna. Konsumsi seng tinggi, dalam sel dinding saluran cerna sebagian diubah menjadi "metalotionin" sebagai simpanan, sehingga absorpsi berkurang.<sup>4</sup> Adanya protein "metalotionin" akibat suplementasi seng diharapkan dapat menetralkan tawas yang mengandung aluminium sebagai logam berat, sehingga kerusakan ginjal dapat dihindari.

Sampai saat ini belum diketahui bagaimanakah suplementasi seng yang dapat menghasilkan "metalotionin" dalam menetralkan tawas yang mengandung logam berat aluminium terhadap kerusakan ginjal yang ditandai dengan peningkatan sel degenerasi dan nekrosis epitel tubulus ginjal. Tujuan penelitian ini adalah membuktikan pengaruh suplementasi seng terhadap gambaran histopatologi ginjal yang ditandai dengan degenerasi dan nekrosis epitel tubulus ginjal pada tikus putih *Rattus norvegicus* yang dalam pakannya ditambahkan tawas.

## **METODE**

### **Rancangan penelitian**

Metode penelitian menggunakan eksperimental dengan desain penelitian *post test* dengan kelompok kontrol (*Randomized post test only control-group design*). Pemeliharaan dan intervensi hewan coba dilaksanakan di Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu (LPPT), Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta. Pemeliharaan semenjak masa seleksi sampai masa perlakuan berlangsung dalam waktu 4 minggu.

### **Hewan coba**

Penentuan jumlah sampel dilakukan dengan menggunakan rumus:<sup>7</sup>

$$BS = (t - 1) (r - 1) \geq 15$$

"t" adalah Jumlah kelompok, "r" adalah Jumlah hewan coba tiap kelompok perlakuan.

Penelitian dengan 3 kelompok perlakuan dan 1 kelompok kontrol, sehingga  $t=4$ ,  $(4-1)(r-1) \geq 15$  ---  $r \geq 6$ . Jumlah tikus yang digunakan sebanyak 6 untuk masing-masing kelompok (3 kelompok perlakuan dan 1 kelompok kontrol) sehingga jumlah sampel keseluruhan yang digunakan dalam penelitian ini adalah 24 ekor. Jumlah tikus tiap-tiap kelompok ditambah 1 sebagai cadangan untuk mengantisipasi kemungkinan tikus ada yang mati, sehingga jumlah keseluruhan ada 28 ekor tikus *Rattus norvegicus*. semua tikus dipilih yang berjenis kelamin jantan dan berusia 15 minggu

### **Suplementasi seng**

Intervensi dilakukan dengan cara menambahkan suplementasi seng dengan dosis tertentu pada tawas dalam pakan *rattus nuvegicus*. Dosis suplementasi seng yang dipakai secara bertingkat mulai 0,2mg, 0,4mg dan 0,8mg. Sedangkan konsentrasi tawas yang dipakai adalah 4%. Pemeriksaan laboratorium histopatologi ginjal dilakukan setelah 30 hari dan dibandingkan dengan kontrol.

### **Pajanan Al**

Tawas yang diberikan adalah  $Al_2(SO_4)_3$  yang diberikan bersama dengan pakan standart tikus dengan konsentrasi 4%. Kebutuhan pakan tikus adalah 10% dari berat badan tikus, sehingga jika berat badan tikus rata-rata 200 gr maka jumlah kebutuhan pakan per gr berat badan adalah 20 gr. Tawas yang diberikan dalam bentuk kristal adalah 4% dari 20 gr yaitu 0,8 gr yang dicampur dalam pakan tersebut.

### **Pengukuran parameter kerusakan ginjal**

Pembacaan jaringan ginjal dilakukan melalui pembedahan tikus putih *Rattus norvegicus* pada semua hewan coba baik pada kelompok kontrol maupun perlakuan. Organ ginjal yang didapat selanjutnya dilakukan fiksasi menggunakan formalin 10%, dehidrasi dengan menggunakan alkohol bertingkat 50%, 70%, 85%, 96% dan 100%. Setelah dehidrasi maka dilakukan "clearing", "impregnating", "imbedding" dan "mounting". Akhir dari prosesing jaringan selanjutnya dilakukan pengamatan atau pembacaan pada kelompok kontrol maupun

perlakuan. Pengamatan atau pembacaan preparat dilakukan dengan cara melihat prosentase kerusakan degenerasi sel epitel tubulus proksimal ginjal. Interpretasi hasil:

Normal bila tidak terjadi kerusakan.

Kategori 1 : untuk kerusakan 0 – 5%

Kategori 2 : untuk kerusakan 6 – 25%

Kategori 3 : untuk kerusakan 26 – 50%

Kategori 4 : untuk kerusakan > 50%

### Analisis data

Analisis deskriptif dan statistik dengan melakukan uji normalitas distribusi menurut kelompok intervensi dengan uji *Kolmogorov-Smirnov*, dan dinyatakan normal sehingga untuk mengetahui perbedaannya dilakukan uji ANOVA. Besarnya perbedaan pada masing-masing kelompok perlakuan dianalisis lebih lanjut dengan uji *Bonferroni*.

### Ethical clearance

Penelitian mendapatkan *ethical clearance* dari komisi etik FK UNDIP Semarang. Hasil *ethical clearance* diberitahukan ke kepala Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu (LPPT), Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta dan disetujui untuk pelaksanaan penelitian.

## HASIL

### Kerusakan tubulus ginjal

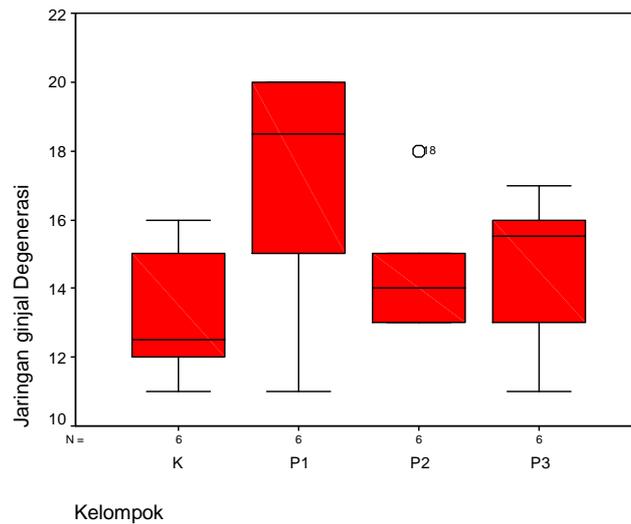
Telah dilakukan penelitian terhadap duapuluh empat tikus putih galur Wistar *Rattus norvegicus* umur 15 minggu dengan berat badan 180-220 gram yang diberi pakan standar (AIN-93) dicampur dengan tawas 4% sebagai kontrol dan perlakuan berupa suplementasi seng bertingkat 0,2 mg/hari, 0,4 mg/hari, 0,8 mg/hari selama 30 hari. Tikus diambil darahnya melalui *plexus retro orbitalis* untuk pemeriksaan kadar hemoglobin, hematokrit, jumlah eritrosit, retikulosit dan dilakukan pembedahan jaringan ginjal untuk pemeriksaan jumlah sel nekrosis dan degenerasi epitel tubulus ginjal sebagai parameter kerusakan tubulus ginjal. Hasil lengkap pemeriksaan kadar hemoglobin, hematokrit, jumlah eritrosit, retikulosit, jumlah sel nekrosis dan degenerasi dapat dilihat pada lampiran 2 dan 3.

Pemberian suplemen seng pada tikus putih *Rattus norvegicus* yang diberi pakan tawas 4% berdasarkan hasil pemeriksaan laboratorium memberikan gambaran sel-sel epitel tubulus ginjal yang mengalami degenerasi dan nekrosis seperti terlihat pada tabel 1.

Tabel 1. Rerata jumlah sel degenerasi dan nekrosis (dalam 100 sel) epitel tubulus ginjal tikus *Rattus norvegicus* pada kelompok kontrol, perlakuan 1, 2 dan 3

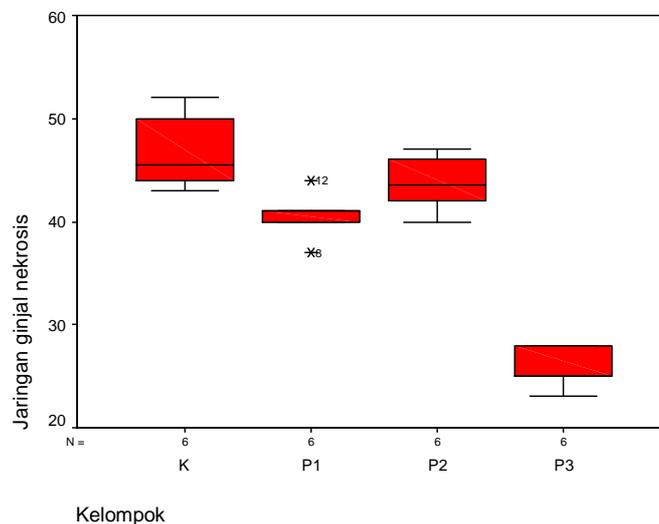
Kelompok	Degenerasi		Nekrosis	
	Rerata	SD	Rerata	SD
K	13	1,94	47	3,55
P1	17	3,54	41	2,25
P2	15	1,87	43	2,58
P3	15	2,25	26	1,96

Berdasarkan tabel 1, jumlah rata-rata sel epitel tubulus ginjal yang mengalami degenerasi pada kelompok kontrol (K)  $13 \pm 1,94$  sel, kelompok perlakuan 1 (P1), kelompok perlakuan 2 (P2), kelompok perlakuan 3 (P3), berturut-turut adalah  $17 \pm 3,54$ ,  $15 \pm 1,87$  sel,  $15 \pm 2,25$  sel. Jumlah rata-rata sel epitel tubulus ginjal yang mengalami degenerasi pada kelompok kontrol (K) lebih rendah jika dibandingkan dengan jumlah rata-rata sel epitel tubulus ginjal yang mengalami degenerasi kelompok perlakuan 1, kelompok perlakuan 2 dan kelompok perlakuan 3. jumlah rata-rata sel epitel tubulus ginjal yang mengalami degenerasi pada keempat kelompok tikus percobaan dapat dilihat pada gambar 1 berikut.



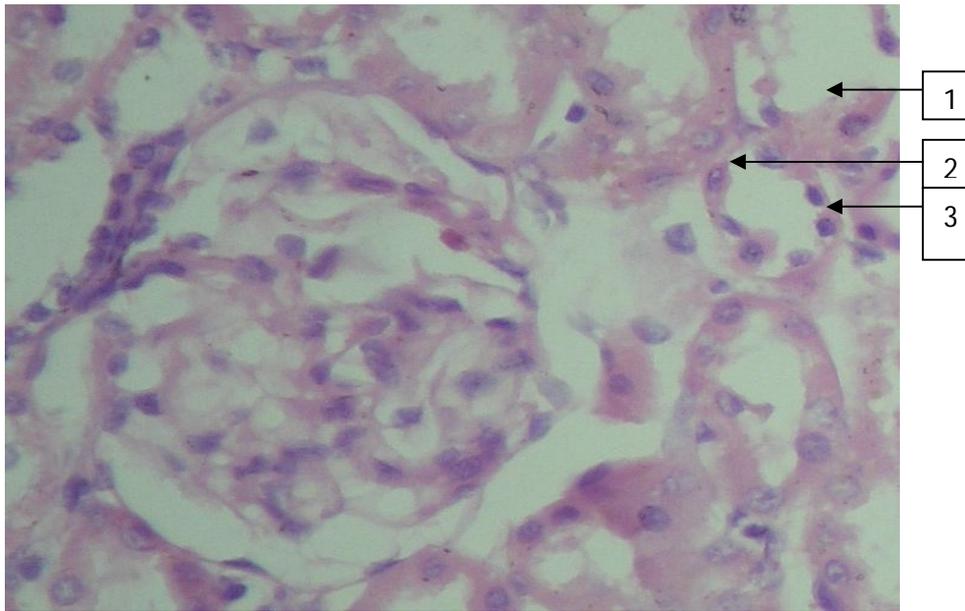
Gambar 1. Bokspot rerata jumlah sel degenerasi ( dalam 100 sel) epitel tubulus ginjal tikus *Rattus nurvegicus* pada kelompok kontrol, perlakuan 1, 2 dan 3

Jumlah rata-rata sel epitel tubulus ginjal yang mengalami nekrosis pada kelompok kontrol (K)  $47 \pm 3,55$  sel, kelompok perlakuan 1 (P1), kelompok perlakuan 2 (P2), kelompok perlakuan 3 (P3), berturut-turut adalah  $41 \pm 2,25$ ,  $43 \pm 2,58$  sel,  $26 \pm 1,96$  sel. Jumlah rata-rata sel epitel tubulus ginjal yang mengalami nekrosis pada kelompok kontrol (K) lebih tinggi jika dibandingkan dengan jumlah rata-rata sel epitel tubulus ginjal yang mengalami nekrosis kelompok perlakuan 1, kelompok perlakuan 2 dan kelompok perlakuan 3. Jumlah rata-rata sel epitel tubulus ginjal yang mengalami nekrosis tertinggi pada kelompok kontrol dan terendah pada kelompok perlakuan 3 yang diberi suplemen seng 0,8 mg/tikus per hari. Sebaran sel epitel tubulus ginjal yang mengalami nekrosis pada keempat kelompok tikus percobaan dapat dilihat pada gambar 2 berikut.



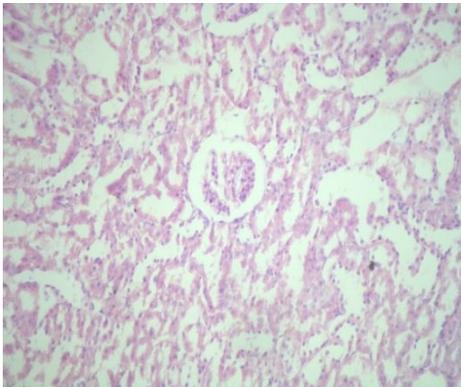
Gambar 2. Bokspot rerata jumlah sel nekrosis (dalam 100 sel) epitel tubulus ginjal tikus *Rattus nurvegicus* pada kelompok kontrol, perlakuan 1, 2 dan 3

Gambaran sel-sel epitel tubulus ginjal tikus *Rattus norvegicus* yang normal, degenerasi dan nekrosis dapat dilihat pada Gambar 4 berikut:



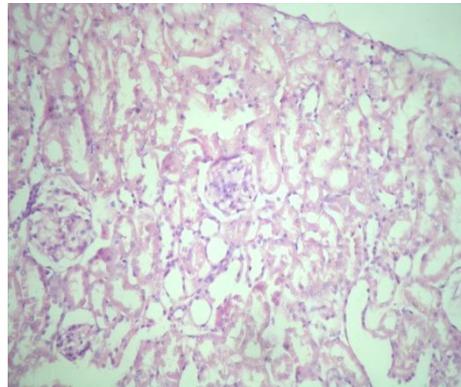
Gambar 3. Morfologi sel epitel tubulus ginjal: no 1 normal, 2 degenerasi, 3 nekrosis

Gambaran sel-sel epitel tubulus ginjal tikus *Rattus norvegicus* yang mengalami degenerasi dan nekrosis pada kelompok kontrol, perlakuan 1, 2 dan 3 dapat dilihat pada Gambar 4 berikut:



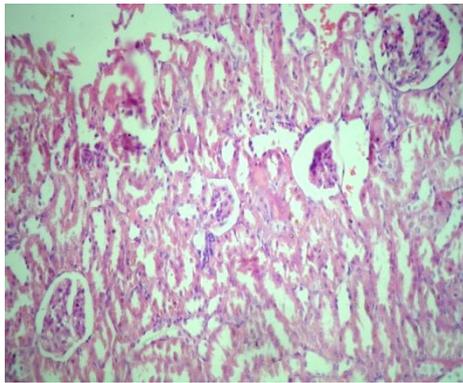
(Perb.400x Budi S, 2009)

K: Pemberian tawas 4% pada pakan tanpa suplementasi seng memperlihatkan pada tubulus ginjal banyak jaringan yang nekrosis



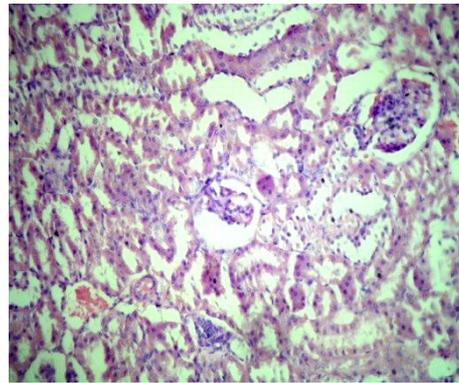
(Perb.400x Budi S, 2009)

P1 : Pemberian tawas 4% pada pakan dan suplementasi seng 0,2 mg, menunjukkan gambaran nekrosis sel epitel tubulus yang masih tinggi.



(Perb.400x Budi S, 2009)

P2 : Pemberian tawas 4% pada pakan dan suplementasi seng 0,4 mg, memperlihatkan gambaran nekrosis sel epitel tubulus yang relatif lebih rendah dibandingkan dengan K dan P 1.



(Perb.400x Budi S, 2009)

P2 : Pemberian tawas 4% pada pakan dan suplementasi seng 0,8 mg, menunjukkan gambaran nekrosis sel epitel tubulus yang semakin berkurang dan banyak dijumpai sel-sel epitel tubulus normal.

Gambar 4 : Gambaran mikroskopis ginjal tikus *Rattus norvegicus* dengan pemberian tawas 4% dan suplemenasi seng 0,2 mg, 0,4 mg dan 0,8 mg selama paparan 30 hari.

Untuk mengetahui tingkat kemaknaan hasil pemeriksaan laboratorium terhadap degenerasi dan nekrosis sel epitel tubulus ginjal dilakukan analisis uji statistik. Berdasarkan uji normalitas data didapatkan semua data berdistribusi normal. Untuk mengetahui perbedaan keempat kelompok perlakuan yaitu kelompok kontrol (K), perlakuan 1 (P1), perlakuan 2 (P2) dan perlakuan 3 (P3) pada sel epitel tubulus ginjal yang mengalami degenerasi maupun nekrosis dilakukan uji ANOVA. Perbedaan pada keempat kelompok menggunakan uji *Bonferroni* untuk mengetahui tingkat kemaknaan pada kelompok kontrol (K) terhadap perlakuan I (P1), perlakuan 2 (P2) dan perlakuan 3 (P3).

Tabel 2. Rekapitulasi uji ANOVA sel epitel tubulus ginjal yang mengalami degenerasi dan nekrosis.

Parameter	F hitung ANOVA	Signifikan
Sel epitel degenerasi	2,684	0,074
Sel epitel nekrosis	73,868	0,000

Berdasarkan analisis statistik uji ANOVA sel epitel tubulus ginjal yang mengalami degenerasi tidak terdapat perbedaan pada keempat kelompok perlakuan yaitu kelompok kontrol (K), perlakuan 1 (P1), perlakuan 2 (P2) dan perlakuan 3 (P3) dengan nilai  $F=2,684$  ( $p=0,074$ ). Terdapat perbedaan pada sel epitel tubulus ginjal yang mengalami nekrosis pada keempat kelompok perlakuan ( $F=73,868$ ,  $p=0,000$ ). Untuk mengetahui tingkat kemaknaan pada kelompok kontrol (K) terhadap perlakuan 1 (P1), perlakuan 2 (P2) dan perlakuan 3 (P3) pada sel epitel tubulus ginjal yang mengalami nekrosis dapat dilihat pada uji *Bonferroni* berikut:

Tabel 3. Rekapitulasi uji *Bonferroni* pada kelompok kontrol (K) terhadap perlakuan I (P1), perlakuan 2 (P2) dan perlakuan 3 (P3) pada sel epitel tubulus ginjal yang mengalami nekrosis

Perlakuan	Rata-rata perbedaan	P value
Nekrosis K dengan P1	6,0	0,005
Nekrosis K dengan P2	3,0	0,388
Nekrosis K dengan P3	21,0	0,000

Analisis statistik pada tabel 3 menunjukkan perbedaan bermakna sel epitel tubulus ginjal yang mengalami nekrosis antara kelompok kontrol (K) dengan kelompok perlakuan 1 ( $p=0,005$ ), dan kelompok kontrol (K) dengan kelompok perlakuan 3 (P) ( $p=0,000$ ).

#### 4.2. PEMBAHASAN

Hasil pemeriksaan laboratorium dan analisis uji statistik, pemberian tawas 4% pada kelompok kontrol dan perlakuan serta suplementasi seng 0,2 mg, 0,4 mg dan 0,8 mg berturut turut pada perlakuan 1,2 dan 3 secara laboratorik menunjukkan perbedaan. Berdasarkan analisis uji statistik perbedaan tersebut tidak semuanya signifikan atau bermakna.

Suplementasi seng 0,2 mg, 0,4 mg, 0,8 mg pada tikus putih *Rattus nurvegicus* yang ditambah tawas 4% terhadap jumlah degenerasi sel epitel tubulus ginjal secara statistik tidak menunjukkan perbedaan bermakna. Morfologi degenerasi sel tersebut dapat terlihat adanya pembengkakan sitoplasma yang bisa disebabkan oleh jejas sel. Bahan kimia termasuk alumunium yang terdapat didalam tawas termasuk bahan yang dapat menimbulkan jejas sel sehingga dapat menyebabkan degenerasi sel epitel tubulus ginjal. Degenerasi sel merupakan peristiwa perubahan morfologi sel akibat cedera dan bisa bersifat reversibel dan ireversibel. Cedera sel reversibel meliputi perubahan membran plasma, perubahan mitokondrial, dilatasi retikulum endoplasma dan perubahan nuklear. Perubahan morfologik tersebut dapat dikenali dengan mikroskop cahaya yaitu adanya pembekakan sel dan degenerasi lemak.<sup>6</sup>

Suplementasi seng dosis 0,2 mg, 0,4 mg, dan 0,8 mg terhadap kontrol yang hanya terdiri dari tawas 4% tidak memberikan perbedaan bermakna mungkin disebabkan peristiwa degenerasi sel bersifat dapat kembali ke sel normal atau berlanjut menjadi nekrosis. Bahan kimia termasuk alumunium dapat menyebabkan kerusakan pada tingkat seluler dengan merubah permeabilitas membran, homeostatis osmotik, keutuhan enzim atau kofaktor dan dapat berakhir dengan kematian seluruh organ. Zat kimia menginduksi cedera sel secara langsung bergabung dengan komponen molekuler kritis atau organel seluler.<sup>6</sup>

Sel cenderung mempertahankan lingkungan dan intraselnya dalam rentang parameter fisiologik yang relatif sempit, sel mempertahankan homeostasis normalnya. Ketika mengalami stres fisiologik atau rangang patologik, sel bisa beradaptasi mencapai kondisi baru dan mempertahankan keangungan hidupnya. Jika kemampuan adaptasi berlebihan, sel mengalami jejas. Dalam batas wkr=tentu cedera bersifat reversibel dan sel kembali ke kondisi stabil semula. Apabila stres berat atau menetap, terjadi cedera ireversibel dan sel akan mati (nekrosis).<sup>6</sup> tidak adanya perbedaan bermakna terhadap kontrol bisa disebabkan oleh jejas sel yang berlebihan dan menetap sehingga peristiwa degenerasi tidak dapat diamati karena sel langsung mengalami nekrosis.

Jumlah nekrosis sel epitel tubulus ginjal mengalami penurunan secara berturut turut pada suplementasi seng 0,2 mg, 0,4 mg, dan, 0,8 mg pada tikus putih *Rattus nurvegicus* yang ditambah tawas 4% bila dibandingkan dengan kontrol. Analisis statistik pada suplementasi seng dosis 0,2 mg dan 0,8 mg dibandingkan dengan kelompok kontrol terdapat perbedaan bermakna. Hal ini bisa disebabkan karena suplementasi seng dapat menghasilkan metallothionein dan mampu mengikat alumunium dalam tawas. Alumunium dalam lingkungan yang asam bersifat ion, sedangkan dalam kondisi pH besar (6-7) bersifat sebagai logam bahkan cenderung berikatan dengan bahan organik membentuk koloid<sup>3</sup>. Dalam tubuh jasad hidup terjadi keseimbangan asam dan basa, sehingga pH 7 adalah netral. Dalam penelitian ini pada kelompok kontrol yang hanya diberi tawas 4% jumlah nekrosis sel epitel tubulus lebih banyak dibanding kelompok perlakuan. sesuai penelitian yang dilakukan Haribi, 2006 bahwa suplementasi tawas 2%, 4%, 6% dan 8% dalam waktu paparan 3 hingga 8 minggu berpengaruh terhadap kerusakan epitel tubulus ginjal<sup>8</sup>

#### PUSTAKA

1. Nurrahman dan Isworo J. Pengaruh Lama Perendaman dan Konsentrasi Tawas terhadap Sifat Fisik, Kimia dan Organoleptik Ikan Tongkol Asap. Dalam Proseding Seminar Teknologi Pangan PATPI. Malang, 2002
2. Haribi R, Yusrin. Konsentrasi Aluminium pada Ikan Asap yang Direndam dalam Larutan Tawas. Penelitian Dasar. Dirjen DikTi. Departemen Pendidikan Nasional. Jakarta, 2005.

3. Cheung RCK, Chan MHM, Ho CS, Lam CWK and Lau ELK. Heavy metal poisoning clinical significance and laboratory investigation. *Asia pasific Analyte Notes*. BD Indispensable to Human Health. Hong Kong. 2001 7(1):22-34
4. Pamungkasiwi E. Mikromineral seng dalam kehidupan manusia. Dinas Kesehatan Provinsi Yogyakarta, 2006. Available from: <http://www.dinkes-diy.org>. Diunduh 11/12/2008.
5. Allen LH. Zinc and Micronutrient Supplement for Children. *Am J Clin Nutr*. 1998;68:495S-8S
6. Richard N, Michel MD, Ramzi S, Cotran. Jejas, Adaptasi dan Kematian Sel. In: *Robins Pathologic Basic of Disease*. 7<sup>th</sup> ed. Alih Bahasa: Prasetyo A, Pendit UB, Priliono T. Vol1. Jakarta: EGC: 2003: 3-28
7. Hanafiah KA. Rancangan Percobaan: Teori dan Aplikasi. Rajawali Pres. Jakarta. 2001: 4
8. Haribi R, Kelainan Fungsi dan Histopatologi Hati dan Ginjal Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Akibat Suplementasi Tawas Dalam Pakan. Penelitian Hibah Bersaing Dirjen Dikti. Departemen Pendidikan Nasional. Jakarta, 2007.