

# **PENGARUH PEMBERIAN DIAZEPAM, FORMALIN & MINUMAN BERALKOHOL TERHADAP JUMLAH ERITROSIT DAN KADAR HEMOGLOBIN MENCIT *Mus musculus L***

**Huda Rahmawati\*, Silvana Tana\*\***

**\*Laboratorium Biologi Struktur dan Fungsi Hewan Jur. Biologi FMIPA UNDIP**

**\*\*Laboratorium Zoologi Jurusan Biologi FMIPA UNHAS**

## **Abstract**

This study aims to determine the influence of diazepam provision, formalin and alcoholic beverages on the number of erythrocytes and hemoglobin levels in mice *Mus musculus L*. The study was carried out with aklimasi 6 days and 30 days in the treatment at Biology Laboratory Animal Structure and Function Department of Biology FMIPA UNDIP. Adult male mice was used that weighing 25-30 gr. This experiment is performed with complete random design is divided into 3 treatment groups and 1 control group with 4 repetitions. Group P1 (0.04 mg diazepam), P2 (100ppm formalin), P3 (alcoholic beverages, alcohol content 4.8%) and controls (aquadest). BR2 feeding and drinking water ad libitum. Results of data analysis by giving diazepam, formalin and alcohol in mice showed no significant different in the number of erythrocytes and hemoglobin levels, in this case given the possibility of a substance capable of metabolized and excreted, so does not affect hematopoiesis and eritropoiesis.

*Keywords: diazepam, formalin, alcoholic beverages, erythrocytes, hemoglobin*

## **Abstrak**

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian diazepam, formalin dan minuman beralkohol terhadap jumlah eritrosit dan kadar hemoglobin pada mencit *Mus musculus L*. Penelitian ini dilaksanakan dengan aklimasi 6 hari dan perlakuan 30 hari di Laboratorium Biologi Struktur dan Fungsi Hewan Jurusan Biologi FMIPA UNDIP. Hewan uji yang digunakan adalah mencit jantan dewasa dengan bobot 25-30 gr. Percobaan ini dilakukan dengan Rancangan Acak Lengkap yang terbagi dalam 3 kelompok perlakuan dan 1 kelompok kontrol dengan 4 pengulangan. Kelompok P1 (diazepam 0,04mg), P2 (formalin 100ppm), P3 (minuman beralkohol, kandungan alkohol 4,8%) dan kontrol (aquadest). Pemberian pakan BR2 dan air minum secara *ad libitum*. Hasil analisis data dengan pemberian diazepam, formalin dan minuman beralkohol pada mencit menunjukkan berbeda tidak nyata pada jumlah eritrosit dan kadar hemoglobin, dalam hal ini kemungkinan zat yang diberikan mampu dimetabolisme dan diekskresikan sehingga tidak mempengaruhi hematopoiesis dan eritropoiesis.

*Kata kunci : diazepam, formalin, minuman beralkohol, eritrosit, hemoglobin*

## PENDAHULUAN

Penggunaan NAPZA (Narkotika, Alkohol, Psikotropika dan Zat aditif lain) di kalangan masyarakat dewasa ini makin marak. NAPZA bila masuk ke dalam tubuh manusia mempengaruhi tubuh terutama otak dan susunan saraf pusat sehingga menyebabkan gangguan kesehatan fisik, psikis dan fungsi sosialnya seperti terjadi kebiasaan, ketagihan serta ketergantungan terhadap NAPZA tersebut. Penggunaan NAPZA oleh masyarakat disebabkan karena beberapa hal yaitu mengikuti trend atau gaya hidup masyarakat modern, keingintahuan yang besar untuk mencoba dan keinginan untuk bersenang-senang serta keperluan yang lain (Subastian, 2008).

Diazepam dapat digolongkan sebagai NAPZA karena memiliki sifat menenangkan sistem saraf pusat, mempengaruhi fungsi tubuh maupun perilaku seseorang, mengubah suasana hati dan perasaan (Anonim, 2007a). Diazepam termasuk obat kimia yang berfungsi sebagai *antidepressant* atau obat penenang. Transportasi diazepam di dalam darah merupakan proses dinamis dimana molekul obat masuk dan keluar jaringan pada kecepatan yang bergantung pada aliran darah, perbedaan konsentrasi dan permeabilitas. Kelarutan dalam lipid memegang peran penting dalam menentukan kecepatan diazepam memasuki sistem saraf pusat (Katzung, 2002).

Diazepam yang masuk ke dalam tubuh akan dimetabolisme dengan bantuan sitokrom P 450. Kerja enzim sitokrom P 450 di jaringan lain selain eritrosit akan membentuk superoksida. Dalam eritrosit sendiri superoksida terbentuk melalui auto oksidasi hemoglobin menjadi methemoglobin. Superoksida ini dapat menyebabkan cedera sel yang berakibat pada kematian sel dan menyebabkan pelepasan ion besi dari feritin sehingga dapat mempengaruhi hemoglobin (Harper, 1979). Oleh karena itu, secara tidak langsung diazepam dapat mempengaruhi hematopoiesis melalui efek-efek

metabolik dan menghambat proliferasi semua elemen seluler di dalam sumsum tulang.

Formalin merupakan bahan aditif makanan yang berbahaya. Penggunaan formalin sebagai pengawet bahan makanan seperti bakso, ikan asin, tahu dan beberapa makanan lainnya secara berlebihan atau lebih dari 1 miligram per liter dapat menyebabkan gangguan berbagai organ dalam tubuh (Katzung, 2002). Konsumsi formalin dalam bahan makanan menyebabkan akumulasi dalam tubuh yang melebihi ambang batas akan menyebabkan keracunan, kerusakan hati, otak, limpa, pankreas, susunan saraf pusat, ginjal, dan jantung (Syukur, 2006).

Formalin yang masuk ke dalam tubuh akan cepat dimetabolisme menjadi asam format dalam jaringan tubuh, khususnya pada hati dan eritrosit (Anonim, 2008). Pembentukan asam format pada eritrosit dapat menimbulkan kondisi asam pada darah karena banyaknya alkali. Kondisi ini mempengaruhi hemoglobin yang berfungsi untuk menjaga keseimbangan asam basa. Oleh karena itu, secara tidak langsung formalin dapat mempengaruhi hematopoiesis melalui efek-efek metabolik dan menghambat proliferasi semua elemen seluler di dalam sumsum tulang.

Alkohol merupakan cairan jernih, tak berwarna, mudah menguap, rasa membakar dan bau karakteristik, dapat bercampur dengan air (Wilson & gisvold, 1982). Alkohol yang terkandung dalam minuman merupakan penekan susunan saraf pusat, disamping itu juga mempunyai efek yang berbahaya pada pankreas, saluran pencernaan, otot, darah, jantung, kelenjar endokrin, sistem pernafasan, perilaku seksual dan efek-efek terhadap bagian lainnya, sekaligus sebagai penyebab terjadinya sindrom alkohol fetus (Panjaitan, 2003).

Alkohol yang masuk ke dalam tubuh akan dimetabolisme menjadi senyawa yang dapat diekskresikan. Proses ini mempengaruhi penyerapan besi yang masuk ke dalam

sel menjadi sedikit. Oleh karena itu, secara tidak langsung alkohol dapat mempengaruhi hematopoiesis melalui efek-efek metabolik dan nutrisi juga mungkin secara langsung menghambat proliferasi semua elemen seluler di dalam sumsum tulang (Katzung, 2002).

Berdasarkan hal tersebut di atas maka perlu diadakan penelitian bagaimana pengaruh pemberian diazepam, formalin dan minuman beralkohol terhadap status darah yaitu dengan pemeriksaan hematologi jumlah eritrosit dan kadar hemoglobin.

## **METODOLOGI**

Penelitian ini dilakukan dengan menggunakan Rancangan Acak Lengkap(RAL) terhadap hewan uji sebanyak 16 ekor dikelompokkan dalam 4 kelompok perlakuan dengan pengulangan sebanyak 4 kali. Kelompok perlakuan tersebut adalah kelompok kontrol yang diberi perlakuan dengan aquadest, P1 (diazepam 0,04 mg sebanyak 0,5 mL per oral / hari), P2 ( formalin 100 ppm sebanyak 0,5 mL per oral /hari, P3 minuman beralkohol (alkohol 4,8%) sebanyak 0,5 mL per oral /hari.

Aklisasi dilakukan selama 6 hari dilanjutkan pemeliharaan untuk perlakuan selama 30 hari. Pemberian masing-masing perlakuan melalui jalur oral sebanyak 0,5 mL dengan bantuan spuit injeksi dan jarum gavage.

Sampel darah diambil melalui sinus orbitalis dengan cara menusukkan tabung hematokrit ke sebelah dorsal kelopak mata. Sampel darah yang mengalir melalui tabung hematokrit ditampung di dalam venojek berisi EDTA. Penentuan jumlah eritrosit dilakukan dengan perhitungan menggunakan bilik hitung hemositometer. Penentuan kadar hemoglobin dilakukan dengan metode sahli.

Parameter yang diamati adalah jumlah eritrosit dan kadar Hemoglobin, sedangkan parameter pendukung berupa konsumsi pakan, konsumsi minum dan suhu ruangan.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

Data hasil penelitian dianalisis dengan menggunakan ANOVA seperti tampak pada tabel 1.

Tabel 1. Hasil analisis konsumsi air minum, konsumsi pakan, jumlah eritrosit dan kadar hemoglobin setelah pemberian diazepam, formalin dan minuman beralkohol selama 30 hari

Parameter	Perlakuan			
	P0	P1	P2	P3
Jumlah eritrosit (juta/mm <sup>3</sup> )	8,825 <sup>a</sup>	7,505 <sup>a</sup>	6,960 <sup>a</sup>	5,655 <sup>a</sup>
Kadar hemoglobin (gram/100mL)	13,5 <sup>a</sup>	13,7 <sup>a</sup>	10,7 <sup>a</sup>	11,9 <sup>a</sup>
Konsumsi pakan (gram)	10,78 <sup>a</sup>	12,46 <sup>a</sup>	12,33 <sup>a</sup>	10,54 <sup>a</sup>
Konsumsi minum (ml)	17,70 <sup>a</sup>	20,70 <sup>a</sup>	22,55 <sup>a</sup>	18,30 <sup>a</sup>

Keterangan: Angka dengan superskrip huruf yang sama dalam 1 baris menyatakan perbedaan tidak nyata.

P0 : kelompok Kontrol

P1 : perlakuan diazepam

P2 : perlakuan formalin

P3 : perlakuan alkohol

Hasil ANOVA menunjukkan bahwa pemberian diazepam, formalin dan minuman beralkohol berbeda tidak nyata terhadap jumlah eritrosit dan kadar hemoglobin. Hasil ANOVA juga menunjukkan bahwa pemberian diazepam, formalin dan minuman beralkohol berbeda tidak nyata terhadap konsumsi pakan dan minum.

Diazepam yang diberikan melalui oral akan masuk ke dalam tubuh melalui saluran digesti. Metabolisme utama diazepam berada di hepar, menghasilkan tiga metabolit aktif. N-Desmetildiazepam (nordiazepam) merupakan salah satu metabolit yang memiliki efek farmakologis yang sama dengan diazepam, dimana waktu paruhnya lebih panjang yaitu antara 30-200 jam. N-Desmetildiazepam kemudian diubah menjadi oxazepam, suatu metabolit aktif yang dieliminasi dari tubuh melalui

proses glukuronidasi. Metabolit yang ketiga adalah Temazepam yang kemudian mengalami konjugasi dengan asam glukuronat sebelum dieliminasi dari tubuh. Metabolisme diazepam ini terjadi dengan bantuan enzim sitokrom P 450 (Subastian, 2008) .

Kerja enzim sitokrom P 450 di jaringan lain selain eritrosit akan membentuk superoksida. Dalam eritrosit sendiri superoksida terbentuk melalui auto oksidasi hemoglobin menjadi methemoglobin. Superoksida ini dapat menyebabkan cedera sel yang berakibat pada kematian sel dan menyebabkan pelepasan ion besi dari feritin sehingga dapat mempengaruhi hemoglobin (Harper, 1979) , dalam hal ini memungkinkan terjadinya penurunan jumlah eritrosit dan kadar hemoglobin.

Pelepasan ion besi dari feritin menyebabkan sintesis hemoglobin berkurang dan terjadi cedera sel yang mengakibatkan kematian eritrosit. Namun dari hasil analisis memberikan pengaruh yang tidak nyata karena kemungkinan diazepam yang diberikan dapat dimetabolisme menjadi oxazepam yang memiliki waktu paruh singkat dan selanjutnya mengalami metabolisme langsung menjadi glukuronida tak aktif yang dapat diekskresikan. Hal ini menyebabkan superoksida yang dihasilkan dari kerja enzim sitokrom P 450 belum menyebabkan cedera sel dan pelepasan ion besi dari feritin yang mengakibatkan tidak terjadi gangguan pada hematopoiesis dan eritropoiesis.

Hal ini juga didukung dari analisis terhadap konsumsi pakan dan konsumsi minum memberikan pengaruh yang tidak nyata, sehingga nutrisi dan osmolaritas sel yang merupakan faktor pendukung proses eritropoiesis masih dalam keadaan cukup sehingga tidak terjadi penurunan jumlah eritrosit dan kadar hemoglobin.

Formalin yang diberikan melalui oral akan masuk kedalam tubuh melalui saluran digesti. Formalin dapat dengan cepat dimetabolisir menjadi asam format

dalam jaringan tubuh, khususnya pada hati dan sel darah merah. Asam format kemudian dapat diekskresikan dalam bentuk karbon dioksida dan air, atau dapat juga dikeluarkan lewat urin sebagai format atau dimetabolisir menjadi group metil yang labil (Anonim, 2008). Formalin juga bersifat mudah larut dalam air sehingga mudah pula untuk diekskresikan (Judarwanto, 2007).

Pembentukan asam format pada eritrosit dapat menimbulkan kondisi asam pada darah karena banyaknya alkali. Kondisi ini mempengaruhi hemoglobin yang berfungsi untuk menjaga keseimbangan asam basa. Namun dari hasil analisis memberikan pengaruh yang tidak nyata karena kemungkinan formalin yang diberikan mampu dimetabolisme menjadi asam format yang selanjutnya menjadi ion format sehingga dapat diekskresikan dan tidak terjadi akumulasi dalam tubuh. Hal ini menyebabkan kondisi darah tidak menjadi asam karena banyaknya alkali sehingga tidak terjadi gangguan proliferasi sel yang mengakibatkan tidak terjadi gangguan pada hematopoiesis dan eritropoiesis.

Hal ini juga didukung dari analisis terhadap konsumsi pakan dan konsumsi minum memberikan pengaruh yang tidak nyata, sehingga nutrisi dan osmolaritas sel yang merupakan faktor pendukung proses eritropoiesis masih dalam keadaan cukup sehingga tidak terjadi penurunan jumlah eritrosit dan kadar hemoglobin.

Minuman beralkohol yang digunakan dalam penelitian ini adalah minuman beralkohol merek "x" dengan kadar alkohol 4,8 %. Minuman beralkohol ini berupa etanol dan termasuk kedalam golongan bir karena memiliki kadar alkohol 4,8 % (Rahayu, 2008). Dari hasil ANOVA menunjukkan bahwa pemberian minuman beralkohol berbeda tidak nyata terhadap jumlah eritrosit dan kadar hemoglobin.

Minuman beralkohol yang diberikan melalui oral akan masuk kedalam tubuh melalui saluran digesti. Setelah diminum, alkohol kebanyakan diabsorpsi di

duodenum melalui difusi. Alkohol kemudian didistribusikan melalui cairan tubuh dan dimetabolisme. Metabolisme primer alkohol adalah di hati, dengan melalui 3 tahap. Pada tahap awal, alkohol dioksidasi menjadi asetaldehid oleh enzim alkohol dehidrogenase (ADH). Enzim ini terdapat sedikit pada konsentrasi alkohol yang rendah dalam darah. Kemudian saat kadar alkohol dalam darah meningkat hingga taraf sedang kecepatan metabolisme menjadi maksimal, yaitu 7-10 gram/jam (setara dengan sekali minum dalam satu jam). Tahap kedua reaksi metabolisme, asetaldehid diubah menjadi asetat oleh enzim aldehid dehidrogenase (Rahayu, 2008).

Dalam keadaan normal, asetaldehid dimetabolisme secara cepat dan biasanya tidak mengganggu fungsi normal. Tahap ketiga merupakan tahap akhir, terjadi konversi gugus asetat dari koenzim A menjadi lemak, atau karbondioksida dan air. Tahap ini juga dapat terjadi pada semua jaringan dan biasanya merupakan bagian dari siklus asam trikarbosit (siklus Krebs). Jaringan otak dapat mengubah alkohol menjadi asetaldehid, asetil koenzim A, atau asam asetat (Rahayu, 2008).

Alkohol secara tidak langsung mempengaruhi hematopoiesis melalui efek-efek metabolik dan nutrisi juga mungkin menghambat proliferasi semua elemen seluler di dalam sumsum tulang. Gangguan hematologis yang terlihat pada peminum kronis adalah berupa anemia ringan yang disebabkan oleh defisiensi asam folat (Katzung, 2002). Namun dari hasil analisis memberikan pengaruh yang tidak nyata karena dimungkinkan tidak terjadi defisiensi asam folat sehingga tidak terjadi penurunan jumlah eritrosit dan kadar hemoglobin. Hal ini didukung dari analisis terhadap konsumsi pakan dan minum yang memberikan pengaruh tidak nyata.

Alkoholik cenderung mempunyai simpanan besi (Fe) yang lebih banyak. Kejadian kelebihan Fe diperkirakan karena etanol merangsang sekresi cairan lambung yang menyebabkan peningkatan penyerapan Fe oleh kelarutan dan reduksinya yang

lebih besar. Ancaman lain yang tidak mustahil bakal diidap alkoholik adalah sirosis dan kerusakan hati. Selain, disebabkan faktor malnutrisi gara-gara alkohol yang terus menerus dikonsumsi, terjadinya akumulasi lemak di hati juga bisa mengakibatkan hiperlipidemia (Pramita, 2007).

Besi merupakan salah satu logam yang dibutuhkan dalam eritropoiesis. Pada kondisi kelebihan besi, lebih sedikit besi memasuki sel dan lebih besar proporsi yang dilepas kembali ke lumen usus (Hoffbrand, 1996). Sehingga dapat mempengaruhi hematopoiesis yang menyebabkan penurunan jumlah eritrosit dan kadar hemoglobin.

Namun dari hasil analisis memberikan pengaruh yang tidak nyata karena kemungkinan alkohol yang diberikan mampu dimetabolisme menjadi asetat dan diekskresikan. Alkohol yang diberikan juga tidak mempengaruhi efek-efek metabolik dan nutrisi yang mungkin menghambat proliferasi semua elemen seluler di dalam sumsum tulang sehingga tidak terjadi gangguan pada hematopoiesis dan eritropoiesis.

Hal ini didukung dari analisis terhadap konsumsi pakan dan minum yang memberikan pengaruh tidak nyata sehingga kebutuhan besi untuk hematopoiesis tercukupi. Oleh karena itu tidak terjadi penurunan jumlah eritrosit dan kadar hemoglobin.

## **KESIMPULAN**

Kesimpulan dari hasil penelitian menunjukkan bahwa pemberian diazepam (0,04 mg), formalin (100 ppm) dan minuman beralkohol (alkohol 4,8%) belum memberikan pengaruh terhadap jumlah eritrosit dan kadar hemoglobin. Kondisi ini kemungkinan disebabkan karena zat yang diberikan mampu dimetabolisme dan diekskresikan sehingga tidak mengganggu proses hematopoiesis dan eritropoiesis.

## DAFTAR PUSTAKA

- Anonim. 2007a. *Diazepam*. <http://en.wikipedia.org/wiki/Diazepam>. 8 September 2007.
- Anonim. 2007b. *Formaldehida*. <http://id.wikipedia.org/wiki/Formaldehida>. 8 September 2007.
- Anonim. 2008. *About Formalin*. [http://forum\\_urindo.com](http://forum_urindo.com). 26 Oktober 2008.
- Anonim. 2009. *Alkohol*. <http://su.wikipedia.org/wiki/Alkohol>. 10 Juni 2009.
- Donatus, I. A. 2006. *Petunjuk Praktikum Toksikologi*. Laboratorium Farmakologi Dan Farmasi Klinik. Yogyakarta.
- Evelyn, P. 1993. *Anatomi dan Fisiologi Hewan*. Gramedia, Jakarta.
- Franson, R.D. 1996. *Anatomi dan Fisiologi Ternak*. Edisi ke-4. Alih bahasa: Sri Gandono dan Koen Praseno. Gajahmada University Press, Yogyakarta.
- Harper, H.A., Rodwell, V.W dan Mayes, P.A. 1979. *Biokimia*. Alih bahasa : M, Muliawan. Lange Medical Publication. Los Altos, California.
- Hart, H. 1987. *Organic Chemistry a Short Course*. Seventh Edition. Houghton Mifflin Company, Boston.
- Hoffbrand, A. V dan Pettit, J.E. 1996. *Essential Haematologi*. Edisi ke 2. Alih bahasa: Dr. Iyan Darmawan. ECG, Jakarta.
- Inomata, S. 2009. *CYP2C19 Genotype Affects Diazepam Pharmacokinetics And Emergence From General Anesthesia*. <http://www.nature.com>. 10 Juni 2009.
- Judarwanto, W. 2007. *Pengaruh Formalin Bagi Sistem Tubuh*. [http://klik-brc.com/index2.php?option=com\\_content&do\\_pdf=1&id=104](http://klik-brc.com/index2.php?option=com_content&do_pdf=1&id=104) . 26 Oktober 2008.
- Kimball, J.W. 1993. *Biologi*. Erlangga, Jakarta.
- Kusumawati, D. 2004. *Bersahabat Dengan Hewan Coba*. Gajah Mada University Press, Yogyakarta.
- Katzung, B.G. 2002. *Farmakologi Dasar dan Klinik*. Edisi 8. Penerbit Salemba Medika, Jakarta.
- Nakae, Y., Noriaki, K. and Akiyoshi, N. 1997. *The Direct Effect of Diazepam and Mediazolam on Myocardial Depression in Cultured Rat Ventricular Myocytes*. <http://www.anesthesia-analgesia.org/cgi/reprint/85/4/729>. 21 Nopember 2007.
- Panjaitan, R.G. 2003. *Bahaya Gagal Hamil yang Diakibatkan Minuman Beralkohol*. Institut Pertanian Bogor. [http://tumoutou.net/702\\_07134/ruqiah\\_gp.htm](http://tumoutou.net/702_07134/ruqiah_gp.htm). 31 Juli 2007
- Philips, W. L. 2005. *Diazepam*. <http://www.mentalhealth.com>. 26 Oktober 2008
- Pramita, Y. 2007. *Alkohol Tak Hanya Bikin Mati Konyol*. <http://www.pikiran-rakyat.com/prprint.php?mib=beritadetail&id=39918> . 26 Oktober 2008
- Price, S.A dan Wilson, L.M.C. 1984. *Patofisiologi*. Alih Bahasa : Peter Anugrah. EGC Penerbit Buku Kedokteran. Jakarta
- Putra, G.B. 2007. *Bahaya Paparan Formalin*. <http://els.fk.ums.ac.id/mod/forum/discuss.php?d=1570>. 8 September 2007.
- Rahayu, N.W.E. 2008. *Perioperatif Pada Pasien Dalam Pengaruh Alkohol*. <http://butterflystillfly.wordpress.com/2009/02/05/perioperatif-pada-pasien-dalam-pengaruh-alkohol/>. 1 Maret 2009.
- Shier, D., Butler, J. and Lewis, R. 2002. *Human Anatomy and Physiologi*. MC Graw Hill. New Delhi.

- Smith, J.B dan Mangkoewidjojo, S. 1988. *Pemeliharaan, Pembiakan dan Penggunaan Hewan Percobaan di Daerah Tropis*. Penerbit Universitas Indonesia, Jakarta.
- Sturkie, P.D. 1976. *Avian Physiology*. Cornell University Press. New York.
- Subastian, Y.R. 2008. *Metabolit Aktif Diazepam*. <http://yosefw.wordpress.com/2008/03/26/metabolit-aktif-diazepam/>. 27 Maret 2008.
- Syukur, D.A. 2006. *Bahaya Formalin dan Boraks*. [http://www.disnakkeswan-lampung.go.id/index2.php?option=com\\_content&do\\_pdf=1&id=246](http://www.disnakkeswan-lampung.go.id/index2.php?option=com_content&do_pdf=1&id=246). 8 Oktober 2007.
- Wilson dan gisvold . 1982. *Kimia Farmasi dan Medisinal Obat*. Bagian I. Alih bahasa: Drs. Achmad Mustofa. IKIP Semarang Press, Semarang.
- Wintrobe, M. M. 1964. *Chemical Haematologi*. 5<sup>th</sup> Ed. Lea and Febiger, Philadelphia.