

KE  
KKA  
TKD. 27/11  
Nur  
e

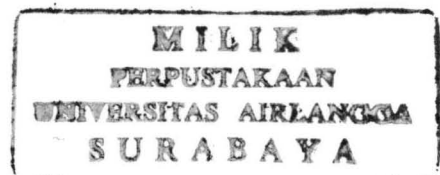
TESIS

**EFEK PEMBERIAN DEKSAMETASON DOSIS RENDAH DAN  
TINGGI TERHADAP JUMLAH RETIKULOSIT, ERITROSIT DAN  
KADAR HEMOGLOBIN PADA TIKUS PUTIH JANTAN  
(*RATTUS NORVEGICUS* GALUR *WISTAR*)**

**PENELITIAN EKSPERIMENTAL LABORATORIS**



**Hawin Nurdiana**



**PROGRAM PASCASARJANA  
UNIVERSITAS AIRLANGGA  
SURABAYA  
2007**

**TESIS**

**EFEK PEMBERIAN DEKSAMETASON DOSIS RENDAH DAN TINGGI  
TERHADAP JUMLAH RETIKULOSIT, ERITROSIT DAN KADAR  
HEMOGLOBIN PADA TIKUS PUTIH JANTAN  
(*RATTUS NORVEGICUS GALUR WISTAR*)**

**PENELITIAN EKSPERIMENTAL LABORATORIS**

**Hawin Nurdiana  
NIM. 090515545M**

**PROGRAM PASCASARJANA  
UNIVERSITAS AIRLANGGA  
SURABAYA  
2007**

**EFEK PEMBERIAN DEKSAMETASON DOSIS RENDAH DAN TINGGI  
TERHADAP JUMLAH RETIKULOSIT, ERITROSIT DAN KADAR  
HEMOGLOBIN PADA TIKUS PUTIH JANTAN  
(*RATTUS NORVEGICUS* GALUR *WISTAR*)**

**PENELITIAN EKSPERIMENTAL LABORATORIS**

**TESIS**

**Untuk memperoleh Gelar Magister  
dalam Program Studi Ilmu Kedokteran Dasar pada Program Pascasarjana  
Universitas Airlangga**

**Oleh**

**Hawin Nurdiana  
NIM. 090515545M**

**PROGRAM PASCASARJANA  
UNIVERSITAS AIRLANGGA  
SURABAYA**

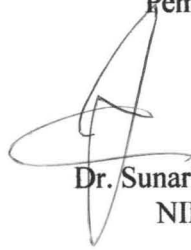
**2007**

**Tanggal 28 Agustus 2007**

TESIS INI TELAH DISETUJUI  
TANGGAL : 20 SEPTEMBER 2007

Oleh

Pembimbing Ketua



Dr. Sunarko Setyawan, dr., MS  
NIP. 131 949 832

Pembimbing



Tjitra Wardani, dr., MS  
NIP. 130 676 013

Mengetahui  
Ketua Program Studi Ilmu Kedokteran Dasar  
Program Pascasarjana Universitas Airlangga


Prof Retno Handajani, dr., MS, PhD  
NIP. 130 541 984

Diuji pada

Tanggal : 28 Agustus 2007

**PANITIA PENGUJI TESIS**

**Ketua : Dr. Elyana Asnar STP, dr., MS**

- Anggota:**
1. Dr. Sunarko Setyawan, dr., MS
  2. Tjitra Wardani, dr., MS
  3. Choesnan Effendi, dr, AIF
  4. Dr. Anwar Ma'ruf, drh., M.Kes
  5. Muhammad Cholil Munif,dr, AIF

## UCAPAN TERIMA KASIH

Pertama-tama saya panjatkan puji syukur kepada Allah SWT atas limpahan rahmat-Nya, sehingga penelitian ini dapat selesai pada waktunya.

Terima kasih tak terhingga dan penghargaan yang setinggi-tingginya saya sampaikan kepada Dr. Sunarko Setyawan, dr, MS selaku pembimbing ketua yang dengan penuh perhatian dan kesabaran selalu memberikan bimbingan, kritik-saran serta dorongan dan motivasi sejak penyusunan proposal, pelaksanaan penelitian hingga selesainya tesis ini.

Terima kasih yang tak ternilai dan penghargaan serta penghormatan setinggi-tingginya saya sampaikan kepada Tjitra Wardani, dr, MS selaku pembimbing yang selalu bersedia meluangkan waktu, tenaga dan pikiran untuk memberikan bimbingan sejak penyusunan proposal, pelaksanaan penelitian hingga selesainya tesis ini.

Dalam kesempatan ini pula, perkenankan saya mengucapkan terima kasih kepada berbagai pihak yang telah bersedia membantu saya yakni :

1. Universitas Muhammadiyah Malang, yang telah memberikan beasiswa selama menempuh pendidikan di Program Pascasarjana Universitas Airlangga Surabaya.
2. Rektor Universitas Airlangga, Prof. Dr. H. Fasich, Apt yang telah memberikan kesempatan menjadi mahasiswa di Program Pascasarjana Universitas Airlangga.
3. Direktur Program Pascasarjana Universitas Airlangga Surabaya dan Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga Surabaya, Prof Dr H Muhammad

- Amin, dr, SpP(K), yang telah memberikan kesempatan menjadi mahasiswa di Program Pascasarjana Universitas Airlangga.
4. Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Muhammadiyah Malang, Fathoni Sadani, dr, yang telah memberikan ijin dan dorongan untuk mengikuti pendidikan di Program Pascasarjana Universitas Airlangga.
  5. Prof Retno Handajani, dr, MS, PhD selaku Ketua Program Studi Ilmu Kedokteran Dasar yang banyak membantu dalam perijinan.
  6. Choesnan Effendi, dr, AIF selaku ketua Minat Ilmu Faal IKD yang telah banyak memberikan bantuan dan bimbingan selama menempuh pendidikan di Program Pascasarjana Universitas Airlangga.
  7. Dr Harijanto JM, dr, AIF, kepala bagian Ilmu Faal Universitas Airlangga Surabaya yang telah banyak memberikan bantuan dan bimbingan selama menempuh pendidikan di Program Pascasarjana Universitas Airlangga.
  8. M. Cholil Munif, dr, AIF, staf pengajar bagian Ilmu Faal Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga yang telah membantu dalam pengolahan data hasil penelitian dan memberikan bimbingan serta masukan selama penyusunan proposal dan tesis.
  9. Panitia penguji proposal dan tesis : Dr Sunarko Setyawan, dr, MS; Tjitra Wardani, dr, MS; Choesnan Effendi, dr, AIF; Dr Elyana Asnar STP, dr, MS, Dr. Anwar Ma'ruf, drh., M.Kes dan Muhammad Cholil Munif, dr, AIF yang telah memberikan masukan dan saran untuk perbaikan tesis saya.
  10. Seluruh Dosen pengajar Progran Studi Ilmu Kedokteran Dasar minat Ilmu Faal yang banyak membantu selama menempuh pendidikan.

- 11.Seluruh staf pengajar dan karyawan bagian Ilmu Faal Fakultas Kedokteran Unair yang telah memberikan dukungan dan bantuan selama saya menempuh pendidikan.
- 12.Seluruh staf pengajar dan karyawan Fakultas Kedokteran Universitas Muhammadiyah Malang yang telah memberikan dukungan dan bantuan selama saya menempuh pendidikan.
- 13.Ibunda dan kedua mertua tercinta, suami tercinta Rofiq Nur Subhi, ST dan buah hati tersayang Reffianza Al Atallah Aisy Sevilen, atas segala kesempatan, pengertian, doa dan dukungan selama menjalani pendidikan di Program Pascasarjana Unair.
- 14.Semua teman-temanku, Purwo Sri Rejeki,dr., Indri Ngesti Rahayu,dr., dan S. Joni Husodo,dr., dan teman-teman IKD yang lain, yang banyak membantuku selama mengikuti program pendidikan di Program Pascasarjana Unair.
- 15.Kepada bapak Herry Soemantoro dan bapak Choirul yang telah banyak membantu dalam penyediaan dan pemeliharaan hewan coba dan pengambilan darah.
- 16.Semua pihak yang telah membantu penyelesaian penelitian dan penyusunan tesis ini yang tidak dapat saya sebutkan satu persatu.  
Dengan segenap kerendahan hati penulisan mohon maaf atas segala kekurangan.

Malang, 15 Agustus 2007

Penulis



## RINGKASAN

**Efek Pemberian Deksametason Dosis Rendah dan Tinggi Terhadap Jumlah Retikulosit, Eritrosit dan Kadar Hemoglobin Pada Tikus Putih Jantan (*Rattus norvegicus* Galur Wistar)**

Hawin Nurdiana

Pada keadaan stress diaktifkan sistem neuroendokrin *hypothalamus-pituitary-adrenal* (HPA) yang menghasilkan *adrenocorticotropic hormone* (ACTH) dan kortisol. Pemaparan kortisol dosis rendah diperlukan untuk mobilisasi energi dan reaksi adaptasi sistem tubuh, diantaranya terjadi peningkatan eritrosit. Sedangkan kortisol dosis tinggi dan lama justru menyebabkan anemia.

Glukokortikoid dosis rendah merangsang *erythropoiesis* dengan meningkatkan prekursor sel eritroid di sumsum tulang dan *Burst forming units - Erythroid* (BFU-E), meningkatkan produksi *erythropoietin* (EPO) di ginjal dan pada hepar meningkatkan sintesis protein, termasuk transferin. Keseluruhan efek ini akan meningkatkan *erythropoiesis* yang digambarkan dengan meningkatnya jumlah retikulosit, eritrosit dan kadar hemoglobin (Hb) di sirkulasi. Pada dosis yang tinggi, glukokortikoid menghambat pembentukan koloni eritroid melalui penurunan proliferasi *Colony forming units - Erythroid* (CFU-E), menurunkan produksi EPO di ginjal, menurunkan sintesis Hb dengan menghambat translasi dari  $\alpha$  dan  $\beta$ -globin, dan meningkatkan sintesis transferin di hepar. Keseluruhan

efek ini akan menurunkan *erythropoiesis* yang digambarkan dengan menurunnya jumlah retikulosit, eritrosit dan kadar Hb di sirkulasi.

Tujuan penelitian ini adalah membuktikan ada perbedaan efek pemberian deksametason (sebagai preparat sintetik glukokortikoid) dosis rendah dan tinggi terhadap produksi eritrosit .

Rancangan penelitian adalah *The Randomized Separate Sample Pretest-Posttest Control Group Design*. Hewan coba *Rattus norvegicus* galur *Wistar* jantan berusia 3-3,5 bulan dibagi dalam 4 kelompok, tiap kelompok 7 ekor. Perlakuan injeksi intramuskular sebanyak satu kali tiap hari selama 6 hari, data diambil 24 jam setelah injeksi terakhir. Kelompok *separate pretest* tidak mendapat perlakuan, sedangkan kelompok perlakuan dilakukan injeksi intramuskular deksametason 0,1 mg / 200 g BB tikus setiap kali injeksi untuk dosis yang rendah dan 1 mg / 200 g BB untuk dosis yang tinggi. Sedang kelompok kontrol *posttest* diberikan injeksi intramuskular larutan *normal saline*. Volume injeksi 0,1 ml. Unit analisis adalah darah yang diambil langsung dari jantung kemudian dilakukan pengukuran jumlah retikulosit (%), eritrosit ( $10^6/\mu\text{l}$ ), dan kadar Hb (g/dl). Pengambilan data kelompok *separate pretest* dilakukan pada awal perlakuan sedang kelompok perlakuan dan kontrol *posttest* dilakukan pada akhir perlakuan.

Hasil yang diperoleh pada kelompok *separate pretest* (retikulosit 1,7143  $\pm$  1,0319 %; eritrosit 8,1686  $\pm$  0,4008  $10^6/\mu\text{l}$ ; dan Hb 15,0429  $\pm$  0,8364 g/dl). Kelompok injeksi deksametason dosis rendah (retikulosit 3,0714  $\pm$  0,6317%; eritrosit 8,7129  $\pm$  0,3398  $10^6/\mu\text{l}$ ; dan Hb 15,4286  $\pm$  0,7319 g/dl). Kelompok injeksi deksametason dosis tinggi (retikulosit 1,7429  $\pm$  0,4036 %; eritrosit

8,6357 ± 0,4660 10<sup>6</sup>/μl; dan Hb 15,1429 ± 1,3352 g/dl). Kelompok kontrol *posttest* (retikulosit 2,7857 ± 1,0961 %; eritrosit 8,2500 ± 0,5426 10<sup>6</sup>/μl; dan Hb 13,8571 ± 0,9589 g/dl). Uji Manova didapatkan beda antara kontrol *posttest* dan *separate pretest* yang signifikan (*Hotelling's trace*, p = 0,001), merupakan efek maturasi. Analisis data selanjutnya dengan menggunakan data kelompok injeksi deksametason dosis rendah dan tinggi yang telah diakurasi dengan delta kontrol *posttest* dan *separate pretest*.

Hasil uji Manova antara kelompok *separate pretest* dan injeksi deksametason dosis rendah didapatkan beda signifikan (*Hotelling's trace*, p = 0,025). Hasil uji univariat didapatkan perbedaan signifikan pada eritrosit (p = 0,038) dan Hb (p = 0,003). Hasil uji Manova antara kelompok *separate pretest* dan injeksi deksametason dosis tinggi tidak didapatkan perbedaan yang signifikan (p = 0,153), namun hasil uji Univariat menunjukkan ada perbedaan yang signifikan pada variabel retikulosit (p = 0,028). Dengan demikian pemberian deksametason dosis rendah meningkatkan jumlah eritrosit dan kadar Hb sedang pemberian deksametason dosis tinggi menurunkan jumlah retikulosit.

## SUMMARY

### **The Effect of Low and High dose Dexamethasone Administration on Reticulocyte, Erythrocyte Count, and Haemoglobin Level in Male White Rats (*Rattus norvegicus* strain Wistar)**

Hawin Nurdiana

In stress condition, hypothalamus-pituitary-adrenal (HPA) neuroendocrine system was activated, yielding adrenocorticotropic hormone (ACTH) and cortisol. Low dose cortisol need for fuel mobilization and body system adaptation, for example increased erythrocyte count. While high dose and chronic cortisol lead to anemia.

Low dose glucocorticoid enhance erythropoiesis by enhancing erythroid precursor and *Burst forming units - Erythroid* (BFU-E), enhance erythropoietin (EPO) production in the renal, and in the liver enhance protein synthesis, including transferrin. These would increase erythropoiesis that was described by the increase in reticulocyte, erythrocyte count and haemoglobin (Hb) level. Whereas, high dose glucocorticoid inhibit erythroid colony formation by decreasing the proliferative rate of *Colony forming units - Erythroid* (CFU-E), reduced EPO production in the renal, decrease Hb synthesis by inhibiting translation of alpha- and beta-globin m-RNA, and increase transferrin synthesis in liver. These would decrease erythropoiesis that was described by the decrease in reticulocyte, erythrocyte count and Hb level.

The objective of this study was to prove the difference between low dose and high dose dexamethasone (synthetic glucocorticoid) administration in erythrocyte production.

This study used the Randomized Separate Sample Pretest-Posttest Control Group Design. The experimental animals were male Wistar strain rats aged 3 - 3.5 months, divided into 4 groups, each comprised 7 rats. Data were taken 24 hours after 6 days with 1 injection/day. Separate pretest group received no treatment. While treatment groups received dexamethasone intramuscular injection with the dose of 0.1 mg / 200 g BW rats in each injection for low dose and 1 mg / 200 g BW for high dose. While posttest control groups received normal saline intramuscular injection. The injection volume was 0.1 ml. The analysis unit was blood taken directly from heart, and subjected to reticulocyte examination (%), erythrocyte ( $10^6/\mu\text{l}$ ), and haemoglobin (g/dl) . Data from separate pretest group were taken at the start of the treatment, while those in treatment and posttest control group were taken at the end of the treatment.

Results obtained in pretest was reticulocyte  $1.7143 \pm 1.0319$  %; erythrocyte  $8.1686 \pm 0.4008$   $10^6/\mu\text{l}$ ; and Hb  $15.0429 \pm 0.8364$  g/dl. Group with low dose dexamethasone injection had reticulocyte  $3.0714 \pm 0.6317$  %; erythrocyte  $8.7129 \pm 0.3398$   $10^6/\mu\text{l}$ ; and Hb  $15.4286 \pm 0.7319$  g/dl. Group with high dose dexamethasone injection had reticulocyte  $1.7429 \pm 0.4036$  %; erythrocyte  $8.6357 \pm 0.4660$   $10^6/\mu\text{l}$ ; and Hb  $15.1429 \pm 1.3352$  g/dl. And the posttest control was reticulocyte  $2.7857 \pm 1.0961$  %; erythrocyte  $8.2500 \pm 0.5426$   $10^6/\mu\text{l}$ ; and Hb  $13.8571 \pm 0.9589$  g/dl. The results of Manova test

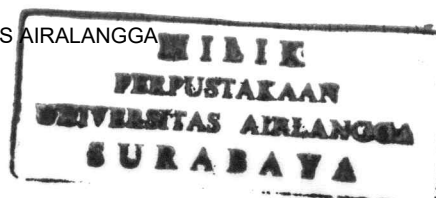
between the posttest control and separate pretest show significant difference ( Hotelling's trace,  $p = 0.001$ ), was maturation effect. Data were analyzed hereinafter using data from group with low and high dose dexamethasone injection that accurred with delta posttest control and separate pretest.

The results of Manova test between the separate pretest and low dose dexamethasone injection show significant difference ( Hotelling's trace,  $p = 0.025$ ). While univariat test, the difference was found in erythrocyte ( $p = 0.038$ ) and Hb ( $p = 0.003$ ). The results of Manova test between the *separate pretest* and high dose dexamethasone injection didn't show difference ( $p = 0.153$ ), but univariat test revealed difference in reticulocyte ( $p = 0.028$ ). In conclusion, low dose dexamethasone administration may increase erythrocyte count and Hb level, while high dose dexamethasone administration may decrease reticulocyte.

**ABSTRACT****The Effect of Low and High dose Dexamethasone Administration on Reticulocyte, Erythrocyte Count, and Haemoglobin Level in Male White Rats (*Rattus norvegicus* strain Wistar)****Hawin Nurdiana**

The effect of low and high dose dexamethasone administration on reticulocyte, erythrocyte count, and haemoglobin (Hb) level remains controversial. This study is aimed to examine the effect of low and high dose dexamethasone on rats. 28 rats are chosen and grouped into control group and treatment group. Separate pretest received no treatment, posttest control groups received normal saline intramuscular injection and treatment groups received dexamethasone intramuscular injection, 0.1 mg / 200 g BW for low dose and 1 mg / 200 g BW for high dose, injection volume was 0.1 ml. The analysis unit was blood taken directly from heart at 24 hours after 6 days with 1 injection/day, and subjected to reticulocyte examination (%), erythrocyte ( $10^6/\mu\text{l}$ ), and haemoglobin (g/dl). Results obtained in separate pretest was reticulocyte  $1.7143 \pm 1.0319$  %; erythrocyte  $8.1686 \pm 0.4008$   $10^6/\mu\text{l}$ ; and Hb  $15.0429 \pm 0.8364$  g/dl. Group with low dose dexamethasone injection had reticulocyte  $3.0714 \pm 0.6317$  %; erythrocyte  $8.7129 \pm 0.3398$   $10^6/\mu\text{l}$ ; and Hb  $15.4286 \pm 0.7319$  g/dl. Group with high dose dexamethasone injection had reticulocyte  $1.7429 \pm 0.4036$  %; erythrocyte  $8.6357 \pm 0.4660$   $10^6/\mu\text{l}$ ; and Hb  $15.1429 \pm 1.3352$  g/dl. And the posttest control was reticulocyte  $2.7857 \pm 1.0961$ %; erythrocyte  $8.2500 \pm 0.5426$   $10^6/\mu\text{l}$ ; and Hb  $13.8571 \pm 0.9589$  g/dl. The results of Manova test between the posttest control and separate pretest show significant difference (Hotelling's trace,  $p = 0.001$ ), was maturation effect. Data were analyzed hereinafter using data from group with low and high dose dexamethasone injection that accuated with delta posttest control and separate pretest. The results of Manova test between the separate pretest and low dose dexamethasone injection show significant difference (Hotelling's trace,  $p = 0.025$ ). While univariat test the difference was found in erythrocyte ( $p = 0.038$ ) and Hb ( $p = 0.003$ ). The results of Manova test between the separate pretest and high dose dexamethasone injection didn't show difference ( $p = 0.153$ ), but univariat test revealed difference in reticulocyte ( $p = 0.028$ ). In conclusion, low dose dexamethasone administration may increase erythrocyte and Hb, while high dose dexamethasone administration may decrease reticulocyte.

**Keywords:** Dexamethasone, Reticulocyte, Erythrocyte, Hb.



## DAFTAR ISI

Halaman

Sampul Depan.....	i
Sampul Dalam.....	ii
Prasyarat Gelar.....	iii
Persetujuan.....	iv
Penetapan Panitia Penguji.....	v
Ucapan Terima Kasih.....	vi
Ringkasan.....	ix
Summary.....	xii
<i>Abstract</i> .....	xv
DAFTAR ISI .....	xvi
DAFTAR GAMBAR.....	xx
DAFTAR TABEL.....	xxi
DAFTAR LAMPIRAN.....	xxii
DAFTAR SINGKATAN.....	xxiii
<b>B A B 1     PENDAHULUAN.....</b>	<b>1</b>
1.1. Latar Belakang .....	1
1.2. Rumusan Masalah .....	3
1.3. Tujuan Penelitian .....	3
1.3.1 Tujuan umum .....	3
1.3.2 Tujuan khusus .....	3
1.4 Manfaat Penelitian .....	4



<b>B A B 2</b>	<b>TINJAUAN PUSTAKA .....</b>	<b>5</b>
2.1	Glukokortikoid .....	5
2.1.1	Korteks adrenal.....	5
2.1.2	Sintesis dan sekresi.....	6
2.1.3	Transpor, metabolisme dan ekskresi glukokortikoid .....	10
2.1.4	Mekanisme kerja.....	13
2.1.5	Efek fisiologik glukokortikoid .....	14
2.1.6	Deksametason.....	17
2.1.7	Dosis pemberian deksametason.....	18
2.2	Eritrosit .....	19
2.2.1	Membran eritrosit .....	20
2.2.2	Metabolisme energi .....	21
2.2.3	Produksi eritrosit .....	22
2.2.4	Karakter eritrosit .....	30
2.2.5	Destruksi eritrosit .....	31
2.2.6	Anemia.....	32
2.3	Efek glukokortikoid terhadap produksi eritrosit.....	35
2.3.1	Efek glukokortikoid dosis rendah pada produksi eritrosit.....	35
2.3.2	Efek glukokortikoid dosis tinggi pada produksi eritrosit.....	37
<b>B A B 3</b>	<b>KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN ...</b>	<b>40</b>
3.1	Kerangka Konseptual Penelitian .....	40
3.2	Penjelasan kerangka konseptual penelitian.....	42

3.3	Hipotesis Penelitian .....	44
<b>B A B 4</b>	<b>MATERI DAN METODE PENELITIAN.....</b>	<b>45</b>
4.1	Jenis Penelitian.....	45
4.2	Populasi, Sampel, Besar Sampel dan Teknik Pengambilan Sampel .....	46
4.2.1	Populasi dan sampel .....	46
4.2.2	Besar sampel .....	46
4.2.3	Teknik pengambilan Sampel .....	47
4.3	Variabel Penelitian .....	47
4.3.1	Variabel bebas.....	47
4.3.2	Variabel tergantung.....	47
4.3.3	Variabel moderator.....	47
4.3.4	Variabel kendali.....	48
4.4	Definisi Operasional Variabel.....	48
4.5	Bahan Penelitian dan Alat Penelitian .....	50
4.6	Tempat dan Waktu Penelitian .....	52
4.7	Prosedur Penelitian .....	52
4.8	Analisis Data .....	54
<b>B A B 5</b>	<b>ANALISIS HASIL PENELITIAN</b>	
5.1	Data Penelitian.....	56
5.2	Analisis dan Hasil Penelitian.....	56
5.2.1	Hasil analisis deskriptif.....	56
5.2.2	Hasil uji normalitas distribusi .....	57
5.2.3	Hasil uji homogenitas.....	57

5.2.4	Hasil analisis $K_{III} - K_0$ .....	58
5.2.5	Hasil analisis deskriptif data koreksi.....	58
5.2.6	Hasil uji normalitas distribusi data koreksi.....	59
5.2.7	Hasil analisis $K_I - K_0$ .....	59
5.2.8	Hasil analisis $K_{II} - K_0$ .....	59
<b>B A B 6</b>	<b>PEMBAHASAN</b> .....	<b>61</b>
<b>B A B 7</b>	<b>PENUTUP</b> .....	<b>69</b>
7.1	Kesimpulan.....	69
7.2	Saran.....	69
Daftar Pustaka	.....	71
Lampiran	.....	75

## DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Jalur sintesis hormon steroid korteks adrenal .....	7
Gambar 2.2 Tahap-tahap dalam kerja hormon. ....	13
Gambar 2.3 Struktur Kimia Deksametason.....	18
Gambar 2.4 Struktur membran eritrosit .....	20
Gambar 2.5 Pembentukan eritrosit .....	24
Gambar 2.6 Sintesis Hb .....	25

## DAFTAR TABEL

Tabel 2.1 Potensi relatif berbagai kortikosteroid dibandingkan dengan kortisol.....	17
Tabel 5.1 Nilai rerata dan SD variabel tergantung pada tiap kelompok.....	56
Tabel 5.2 Nilai rerata dan SD variabel moderator pada tiap kelompok.....	57
Tabel 5.3 Nilai rerata dan SD variabel tergantung data koreksi pada tiap kelompok.....	58
Tabel 5.4 Uji Univariat $K_I - K_0$ .....	59
Tabel 5.5 Uji Univariat $K_{II} - K_0$ .....	60

## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Perhitungan Besar Sampel Penelitian .....	75
Lampiran 2. Pemberian dosis deksametason .....	76
Lampiran 3 Pemeriksaan Retikulosit .....	78
Lampiran 4 Data Hasil Pengukuran Retikulosit, Eritrosit, Hemoglobin, dan Hematokrit .....	79
Lampiran 5 Hasil Analisis Deskriptif Kelompok .....	80
Lampiran 6 Hasil uji Normalitas Distribusi.....	83
Lampiran 7 Hasil Penimbangan Berat badan Tikus .....	85
Lampiran 8 Hasil uji homogenitas hematokrit.....	86
Lampiran 9 Hasil analisis $K_{III} - K_0$ .....	87
Lampiran 10 Data Koreksi .....	88
Lampiran 11 Hasil analisis deskriptif data koreksi .....	89
Lampiran 12 Hasil uji Normalitas Distribusi Data Koreksi.....	92
Lampiran 13 Hasil Analisis KI-K0 .....	94
Lampiran 14 Hasil Analisis KII-K0 .....	97
Lampiran 15 Alur penelitian .....	100
Lampiran 16 Jadwal Pelaksanaan.....	101
Lampiran 17 Gambar Penelitian.....	102

## DAFTAR SINGKATAN

2,3 DPG	: 2,3 difosfoliserat
ACTH	: <i>Adrenocorticotropic hormone</i>
ATP	: <i>Adenosine triphosphate</i>
BB	: Berat Badan
BCB	: <i>Brilliant cresyl blue</i>
BFU-E	: <i>Burst forming units – Erythroid</i>
BW	: Body Weight
Ca <sup>2+</sup>	: Ion kalsium
CBG	: <i>Corticosteroid binding globulin</i>
CFU-E	: <i>Colony forming units – Erythroid</i>
CFU- Gemm	: <i>Colony forming units - Germinal</i>
Cl <sup>-</sup>	: Ion klorida
CO <sub>2</sub>	: Karbondioksida
CRH	: <i>Corticotropin releasing hormone</i>
DNA	: <i>Deoxyribonucleic acid</i>
EPO	: <i>Erythropoietin hormone</i>
GM-CSF	: <i>Granulocyte macrophage – Colony stimulating factor</i>
GR	: <i>Glucocorticoid Receptor</i>
GRE	: <i>Glucocorticoid response element</i>

H <sup>+</sup>	: Ion hidrogen
Hb	: Hemoglobin
Hct	: Hematokrit
HPA	: <i>Hypothalamus – pituitary- adrenal</i>
IL	: Interleukin
K <sup>+</sup>	: Ion kalium
Ko	: Kelompok <i>separate pretest</i> ( tanpa perlakuan)
K <sub>I</sub>	: Kelompok perlakuan 1 (pemberian injeksi intramuskular deksametason dosis 0,1 mg / 200 g BB, 1 kali/hari, selama 6 hari, data diambil 24 jam setelah injeksi terakhir).
K <sub>II</sub>	: Kelompok perlakuan 2 (pemberian injeksi intramuskular deksametason dosis 1 mg / 200 g BB, 1 kali/hari, selama 6 hari, data diambil 24 jam setelah injeksi terakhir).
K <sub>III</sub>	: Kelompok perlakuan 3 (pemberian injeksi intramuskular <i>normal saline</i> , 1 kali/hari, selama 6 hari, data diambil 24 jam setelah injeksi terakhir ).
LDL	: <i>Low density lipoprotein</i>
MCH	: <i>Mean corpuscular hemoglobin</i>
MCHC	: <i>Mean corpuscular hemoglobin concentration.</i>
MCV	: <i>Mean corpuscular volume</i>
Na <sup>+</sup>	: Ion natrium
NADPH	: <i>Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate</i>
O <sub>2</sub>	: Oksigen
PTSD	: <i>Posttraumatic stress disorder</i>



- RNA : *Ribonucleic acid*
- SCF : *Stem cell factor*
- Torbal : *Thorsion balance*
- UPHP : **Unit Penangkaran Hewan Penelitian**

BAB 1  
PENDAHULUAN



### 1.1 Latar Belakang

Kondisi stress banyak terjadi pada kehidupan modern yang penuh persaingan. Pada keadaan stress diaktifkan sistem neuroendokrin *hypothalamus-pituitary-adrenal* (HPA) yang menghasilkan *adrenocorticotropic hormone* (ACTH) dan kortisol (Pacak, 2001). Aktivitas sistem tersebut terutama ditujukan untuk mobilisasi energi dan reaksi adaptasi sistem tubuh (Virus, 1995). Hal tersebut dapat dibuktikan dengan peningkatan glukoneogenesis hepar, peningkatan neutrofil, trombosit dan eritrosit (Ganong, 2005). Namun stress berat dalam waktu yang lama seperti pada olahraga berat dan lama terjadi pseudoanemi walaupun ada pendapat bahwa pseudoanemi disebabkan hemodilusi (Fox, 1993). Atas dasar fenomena diatas belum ada kejelasan apakah stress berat dan lama atau paparan kortisol yang tinggi dan lama dapat memberikan supresi produksi eritrosit.

Pada stress kronik karena olahraga berat dan lama (Szygula, 1990), justru menyebabkan penurunan jumlah eritrosit. Dengan demikian olahraga berat dalam waktu yang lama dapat memberikan dampak penurunan prestasi. Pada *posttraumatic stress disorder* (PTSD) (Weisberg, 2002), terjadi penurunan eritrosit. Penurunan eritrosit menyebabkan *recovery* yang lama.

Penelitian Udupa (1986) secara *in vitro* menemukan glukokortikoid menyebabkan peningkatan proliferasi sel eritroid pada saat jumlah *erythropoietin* (EPO) kurang (Bauer, 1999). Pada manusia yang menderita anemia aplastik,

glukokortikoid dapat mengembalikan *erythropoiesis* normal (Liang, 1994 cit Bauer, 1999). Selain itu, pada *sindrome Cushing* dimana glukokortikoid sirkulasi meningkat dijumpai adanya peningkatan jumlah eritrosit, kadar hemoglobin (Hb) dan hematokrit (Hct) (Bauer, 1999). Penelitian yang dilakukan pada bayi *intrauteri* yang mengalami stress akibat kontraksi rahim terus-menerus justru ditemukan kejadian *fetal anemia* (Broberg, 2003). Sedangkan penelitian yang dilakukan pada olahragawan berat dan lama, ditemukan adanya morbiditas anemia pada 4%-10% sampel (*sports anemia*) (Szygula, 1990). Glukokortikoid dosis rendah merangsang *erythropoiesis* dengan cara meningkatkan prekursor sel eritroid di sumsum tulang (Malgor, 1987) dan *Burst forming units - Erythroid* (BFU-E) (Steinberg, 1981), meningkatkan produksi *erythropoietin* (EPO) di ginjal (Malgor, 1987; Fisher 1998 cit Bauer, 1999), dan meningkatkan sintesis protein di hepar, termasuk transferin (Guyton, 2006; Chou, 1983). Pada dosis yang tinggi, glukokortikoid menghambat pembentukan koloni eritroid melalui penurunan proliferasi *fetal liver Colony forming units - Erythroid* (CFU-E) (Leung, 1985), menurunkan produksi EPO di ginjal (Fisher, 1977), menurunkan sintesis Hb dengan menghambat translasi dari  $\alpha$  dan  $\beta$ -globin (Papaconstantinou, 1983), dan meningkatkan sintesis transferin di hepar (MC Knight, 1980). Meskipun demikian, perubahan dari jumlah retikulosit, eritrosit dan kadar Hb akibat pemberian deksametason dosis rendah dan tinggi belum sepenuhnya dapat dijelaskan.

Berdasarkan uraian diatas, perlu dilakukan penelitian pengaruh stress berat dan lama terhadap kemampuan produksi eritrosit. Untuk membuktikan hal tersebut maka dilakukan model penelitian pemberian deksametason sebagai

preparat sintetik glukokortikoid dengan dosis rendah dan tinggi pada tikus putih (*Rattus norvegicus* galur *Wistar* jantan).

## 1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang di atas, rumusan masalah penelitian adalah:

1. Apakah efek pemberian deksametason dosis rendah, dapat meningkatkan jumlah retikulosit, eritrosit dan kadar Hb dalam darah?
2. Apakah efek pemberian deksametason dosis tinggi, dapat menurunkan jumlah retikulosit, eritrosit dan kadar Hb dalam darah?

## 1.3 Tujuan Penelitian

### 1.3.1 Tujuan Umum

Membuktikan ada perbedaan efek pemberian deksametason dosis rendah dan tinggi terhadap produksi eritrosit .

### 1.3.2 Tujuan khusus

Tujuan khusus penelitian meliputi:

1. Membuktikan efek pemberian deksametason dosis rendah, dapat meningkatkan jumlah retikulosit, eritrosit dan kadar Hb dalam darah.
2. Membuktikan efek pemberian deksametason dosis tinggi, dapat menurunkan jumlah retikulosit, eritrosit dan kadar Hb dalam darah.

#### 1.4 Manfaat penelitian

Manfaat penelitian adalah untuk:

1. Memberikan solusi dalam meningkatkan kualitas (kadar Hb) dan kuantitas (jumlah retikulosit dan eritrosit) produksi eritrosit.
2. Melihat dampak stress kronis pada produksi eritrosit.

## **BAB 2**

### **TINJAUAN PUSTAKA**

#### **2.1 Glukokortikoid**

Hormon glukokortikoid berasal dari korteks adrenal. Hormon ini merupakan senyawa steroid, dibentuk dari kolesterol dan diabsorpsi secara langsung dari sirkulasi darah melalui proses endositosis (Goldfien, 2001). Glukokortikoid bekerja dengan pengikatan pada reseptor sitosolik yang spesifik yang merupakan perantara dari kerja hormon-hormon ini (Greenspan, 2000).

##### **2.1.1 Korteks adrenal**

Korteks adrenal berasal dari mesodermal dan sudah dapat dikenal sebagai organ yang terpisah pada janin berumur 2 bulan. Pada kehamilan usia 2 bulan, komposisi korteks terdiri dari zona fetal dan zona definitif. Korteks adrenal dengan sangat cepat tumbuh besar, pada pertengahan dari kehamilan ternyata lebih besar dari ginjal dan jauh lebih besar daripada kelenjar orang dewasa bila dibandingkan dengan total massa tubuh.

Setelah kelahiran, zona fetal berangsur menghilang. Selama 3 tahun berikutnya, korteks adrenal dewasa tumbuh dari sel-sel lapisan luar dari korteks dan berdiferensiasi menjadi 3 zona dewasa: bagian luar zona glomerulosa, bagian tengah zona fasikulata dan bagian dalam zona retikularis. Zona glomerulosa, yang memproduksi aldosteron, berkurang pada aktifitas 17  $\alpha$ -hidroksilase sehingga tidak dapat memproduksi kortisol atau androgen. Zona fasikulata merupakan lapisan korteks adrenal yang paling tebal dan menghasilkan kortisol serta

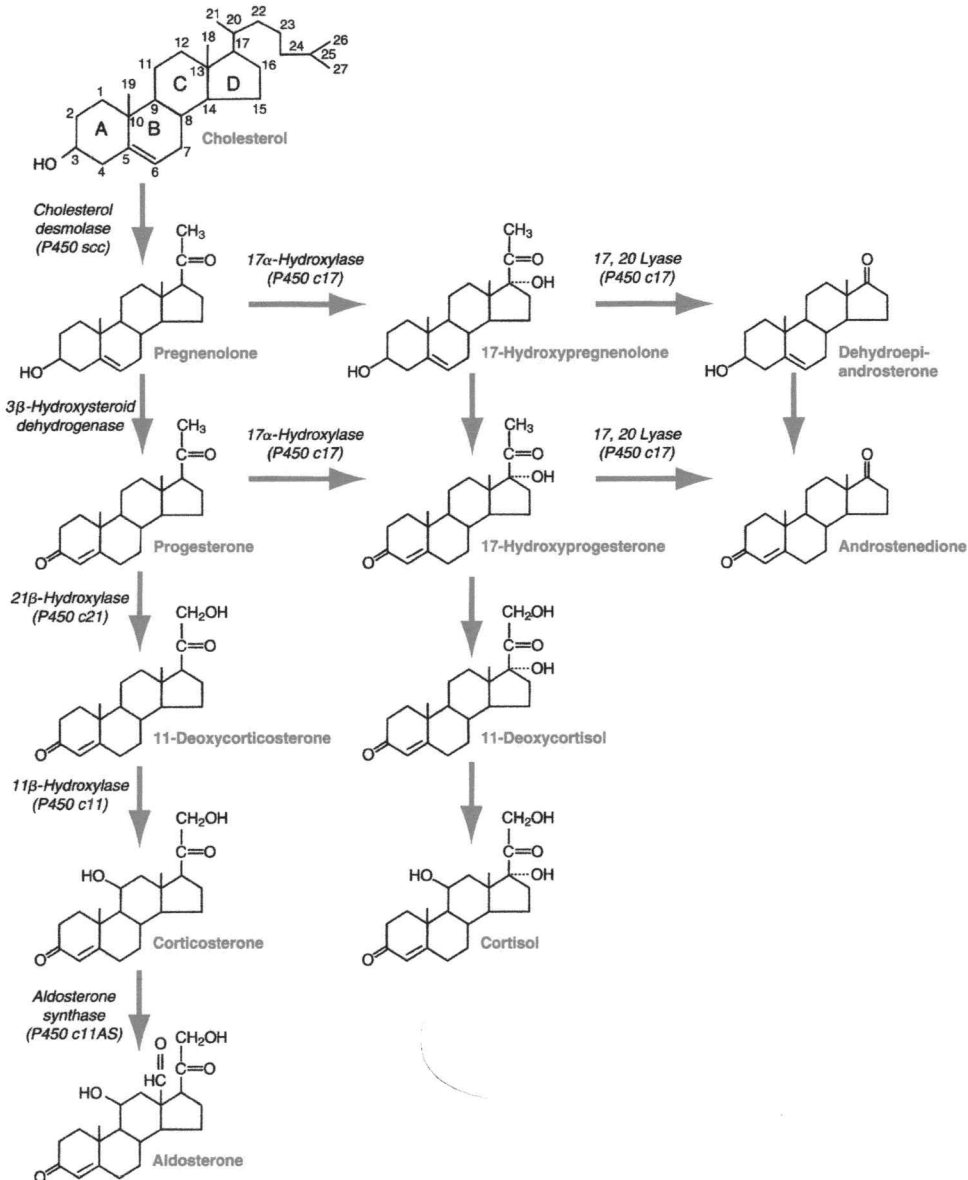
androgen. Zona retikularis bagian dalam melingkari medula adrenal, menghasilkan kortisol dan androgen. Zona fasikulata dan retikularis diatur oleh *adrenocorticotropic hormone* (ACTH), kekurangan atau kelebihan dari hormon ini mempengaruhi struktur dan fungsi dari kedua lapisan tersebut. Sel-sel zona fasikulata dapat memberikan respons secara akut terhadap stimulasi dengan meningkatkan produksi kortisol, sedangkan sel-sel retikularis yang mempertahankan sekresi basal glukokortikoid juga terangsang dengan rangsangan ACTH yang terus-menerus (Greenspan, 2000).

### 2.1.2 Sintesis dan sekresi

Glukokortikoid yang utama pada manusia adalah kortisol (Goldfien, 2001). Sintesis dan sekresinya diregulasi secara ketat oleh sistem saraf pusat, yang sangat sensitif terhadap umpan balik negatif yang ditimbulkan oleh kortisol dalam sirkulasi dan glukokortikoid eksogen(sintetis) (Chrouses dan Margioris, 2002).

Jalur utama sintesis hormon korteks adrenal yang terjadi secara alami di dalam tubuh diringkas dalam Gambar 2.1. Prekursor dari semua steroid adalah kolesterol. Sebagian kolesterol disintesis dari asetat, tetapi sebagian besar diambil dari *Low Density Lipoprotein* ( LDL ) dalam sirkulasi. Reseptor LDL banyak ditemukan di sel-sel korteks adrenal. Kolesterol mengalami esterifikasi dan disimpan dalam butir-butir lemak. Kolesterol ester hidrolase mengkatalisis pembentukan kolesterol bebas dalam butir-butir lemak. Kolesterol diangkut ke mitokondria oleh suatu protein pembawa sterol, untuk kemudian diubah menjadi pregnenolon dalam suatu reaksi yang dikatalisis

oleh enzim yang dikenal sebagai kolesterol desmolase atau enzim pengurai rantai samping. Enzim ini, seperti hampir semua enzim yang terlibat dalam biosintesis steroid, adalah anggota dari superfamili sitokrom P450, dan juga dikenal sebagai P460scc atau CYP11A1.



Gambar 2.1 Jalur sintesis hormon steroid korteks adrenal (Guyton, 2006)

Pregnenolon bergerak ke retikulum endoplasmik halus, tempat sebagian dari hormon tersebut mengalami dehidrogenasi untuk membentuk



progesteron melalui suatu reaksi yang dikatalisis oleh  $3\beta$ -hidroksisteroid dehidrogenase. Enzim ini mempunyai berat molekul 46.000 dan bukan suatu sitokrom P450. Enzim ini juga mengatalisis konversi  $17\alpha$ -hidroksipregnenolon menjadi  $17\alpha$ -hidroksiprogesteron, dan konversi dehidroepiandrosteron menjadi androstenedion (Gambar 2.1) di dalam retikulum endoplasmik halus.  $17\alpha$ -hidroksipregnenolon dan  $17\alpha$ -hidroksiprogesteron dibentuk dari pregnenolon dan progesteron, berturut-turut (Gambar 2.1) oleh kerja dari  $17\alpha$ -hidroksilase. Enzim ini adalah satu dari sitokrom P450, dan juga dikenal sebagai  $P450_{C17}$  atau CYP17. Terletak di bagian lain dari enzim yang sama, terdapat kegiatan  $17,20$ -liase yang memecah ikatan  $17,20$ , mengubah  $17\alpha$ -pregnenolon dan  $17\alpha$ -progesteron menjadi steroid-steroid C19, dehidroepiandrosteron dan androstenedion. Hidroksilasi progesteron menjadi 11-deoksikortikosteron dan hidroksilasi  $17\alpha$ -hidroksiprogesteron menjadi 11-deoksikortisol juga berlangsung di retikulum endoplasmik halus. Reaksi-reaksi ini dikatalisis oleh  $21\beta$ -hidroksilase, suatu sitokrom P450 yang juga dikenal sebagai  $P450_{C21}$  atau CYP21A2.

11-deoksikortikosteron dan 11-deoksikortisol masuk kembali ke mitokondria, tempat mereka menjalani 11-hidroksilasi untuk membentuk kortikosteron dan kortisol. Reaksi-reaksi ini berlangsung di zona fasikulata dan zona retikularis dan dikatalisis oleh enzim  $11\beta$ -hidroksilase, suatu sitokrom P450 yang juga dikenal sebagai  $P450_{C11}$  atau CYP11B1

Di zona glomerulosa, tidak ada  $11\beta$ -hidroksilase tetapi ada enzim yang sangat erat kaitannya, bernama aldosteron sintase. Sitokrom P450 ini

95% identik dengan 11 $\beta$ -hidroksilase dan juga dikenal sebagai P450<sub>C11A5</sub> atau CYP11B2. Gen-gen yang mengkode CYP11B1 dan CYP11B2 berlokasi pada kromosom 8. Namun, aldosteron sintase biasanya terdapat hanya di zona glomerulosa. Zona glomerulosa juga tidak memiliki 17 $\alpha$ -hidroksilase. Itulah sebabnya mengapa zona glomerulosa dapat membuat aldosteron, tetapi gagal untuk membuat 17-hidroksisteroid atau hormon-hormon seks.

Selanjutnya, terdapat subspecialisasi di dua zona terdalam. Zona fasikulata memiliki lebih banyak kegiatan 3 $\beta$ -hidroksisteroid dehidrogenase dari zona retikularis, dan zona retikularis memiliki lebih banyak kofaktor yang diperlukan untuk ekspresi kegiatan 17,20-liase dari enzim 17 $\alpha$ -hidroksilase. Oleh karena itulah, zona fasikulata membuat lebih banyak kortisol dan kortikosteron, dan zona retikularis membuat lebih banyak androgen. Sebagian besar dehidroepiandrosteron yang terbentuk, diubah menjadi dehidroepiandrosteron sulfat oleh adrenal sulfokinase, dan enzim ini juga berada di zona retikularis (Ganong, 2005).

Pada orang dewasa normal, disekresi 10-20 mg kortisol setiap hari, tanpa adanya stress (Chrousos dan Margioris, 2002). Sekresi kortisol endogen ada di bawah pengaruh sumbu hipotalamus-pituitari-adrenal (HPA). Hipotalamus mensekresi *corticotropin-releasing hormone* (CRH) yang merupakan regulator utama dari sekresi kortisol. Sekresi CRH terjadi dalam waktu yang pendek, puncaknya sekitar pukul 8 pagi dan terendah pada malam hari. CRH merangsang pituitari/ hipofisis anterior untuk mensekresi ACTH yang selanjutnya merangsang produksi adrenal untuk membentuk kortisol. Sistem ini merupakan mekanisme

umpan balik. Steroid yang diberikan sinkron dengan puncak ACTH (pagi) tidak menunjukkan efek supresi sumbu HPA dibanding dengan pemberian sewaktu kadarnya terendah (malam) (Rengganis, 2006).

### **2.1.3 Transpor, Metabolisme, dan Ekskresi Glukokortikoid**

#### **A. Pengikatan Glukokortikoid**

Pada plasma, kortisol terikat pada protein dalam sirkulasi. *Corticosteroid Binding Globulin* (CBG) - suatu globulin  $\alpha_2$  - yang disintesis oleh hati, mengikat 90% hormon dalam sirkulasi pada kondisi normal. Sedangkan sisanya (sekitar 5-10%) bersifat bebas atau terikat lemah pada albumin (kira-kira 5%) untuk menimbulkan efek pada sel target (Chrousos dan Margioris, 2002). Kortikosteron juga terikat secara serupa, tetapi dengan derajat yang lebih rendah. Dengan demikian, waktu paruh kortisol dalam sirkulasi lebih lama (sekitar 60-90 menit) daripada kortikosteron (50 menit). Waktu paruh dapat meningkat apabila terjadi stress, hipotiroidisme, atau penyakit hati. Steroid yang terikat, secara fisiologik tidak aktif. Oleh karena ikatan protein ini, relatif sedikit kortisol dan kortikosteron bebas yang terdapat di kemih (Ganong, 2005).

Konsentrasi kortisol dalam plasma cenderung tinggi pada pagi hari dan rendah pada malam hari. Hal ini tergantung juga pada kebiasaan tidur, bila kebiasaan tidur berubah maka akan timbul perubahan siklus (Guyton, 2006). Kortisol akan diabsorpsi dengan baik bila diberikan secara oral. Kadar tertinggi akan cepat tercapai di dalam cairan tubuh bila diberikan secara intravena,

sedangkan untuk mendapatkan efek yang lama sebaiknya diberikan secara intramuskuler (Suherman, 2000).

Kortisol yang terikat berfungsi sebagai cadangan sirkulasi hormon yang mempertahankan agar pasokan kortisol bebas tetap tersedia untuk jaringan. Pada kadar kortisol plasma total yang normal (13,5 µg/dL, atau 375 nmol/L), hanya sedikit terdapat kortisol bebas dalam plasma, tetapi tempat ikatan pada CBG menjadi jenuh bila kortisol plasma total melebihi 20 µg/dL. Pada kadar plasma yang lebih tinggi, terdapat sedikit pengikatan ke albumin tetapi peningkatan utama adalah pada fraksi yang tidak terikat (Ganong, 2005). Kortikosteroid sintetis seperti deksametason terikat pada albumin dalam jumlah besar dibandingkan CBG (Chrousos dan Margioris, 2002).

CBG disintesis di hati, dan pembentukannya ditingkatkan oleh estrogen. Bila kadar CBG meningkat, lebih banyak kortisol yang terikat, dan pada awalnya akan terjadi penurunan kadar kortisol bebas. Hal ini merangsang sekresi ACTH, dan akan lebih banyak kortisol disekresikan sampai keseimbangan baru tercapai, yaitu kortisol yang terikat meningkat tetapi kortisol bebas normal. Perubahan dengan arah berlawanan terjadi bila kadar CBG turun (Ganong, 2005).

## **B. Metabolisme dan Ekskresi Glukokortikoid**

Kortisol dimetabolisme di hati, yang merupakan tempat utama katabolisme glukokortikoid. Sebagian besar kortisol direduksi menjadi dihidrokortisol lalu menjadi tetrahidrokortisol, yang dikongjugasi menjadi asam glukuronat. Sistem glukuronil transferase yang berperan dalam perubahan ini

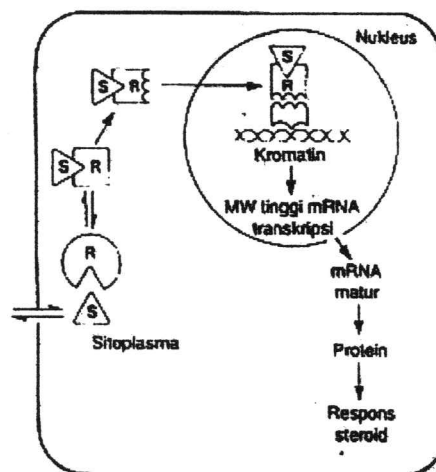
juga mengkatalisis pembentukan glukuronida bilirubin serta sejumlah hormon dan obat. Terdapat inhibisi kompetitif antara substrat-substrat ini memerlukan sistem enzim tersebut.

Hati dan jaringan lain mengandung enzim  $11\beta$ -hidroksisteroid dehidrogenase. Terdapat, paling tidak, dua bentuk enzim ini. Tipe 1 mengkatalisis baik konversi kortisol menjadi kortison maupun reaksi sebaliknya, meskipun fungsi utamanya adalah sebagai suatu reduktase, yaitu membentuk kortisol dari kortikosteron. Tipe 2 mengkatalisis hampir sematamata konversi satu arah dari kortisol menjadi kortison. Kortison adalah suatu glukokortikoid aktif dan dikenal baik karena penggunaannya yang luas di dunia kedokteran, tetapi oleh kelenjar adrenal tidak disekresikan dalam jumlah yang dapat dinilai. Hanya sedikit, walaupun ada, kortison yang dibentuk di hati masuk ke dalam sirkulasi, karena molekul ini segera direduksi dan dikonjugasi membentuk tetrahidrokortison glukuronida. Turunan tetrahidroglukuronida ("konjugat") kortisol dan kortikosteron bersifat mudah larut, masuk ke dalam sirkulasi namun tidak terikat ke protein, serta dengan cepat diekskresikan dalam kemih, sebagian dengan sekresi tubular.

Sekitar 10% kortisol yang disekresikan diubah di hati menjadi turunan-turunan 17-ketosteroid kortisol dan kortison. Ketosteroid sebagian besar mengalami konjugasi dengan sulfat lalu diekskresikan dalam kemih. Terbentuk metabolit lain, termasuk turunan 20-hidroksi. Terdapat sirkulasi enterohepatik glukokortikoid, dan sekitar 15% kortisol yang disekresikan diekskresikan di tinja. Metabolisme kortikosteron serupa dengan metabolisme kortisol, kecuali bahwa molekul ini tidak membentuk turunan 17-ketosteroid (Ganong, 2005).

### 2.1.4 Mekanisme Kerja

Cara kerja glukokortikoid diawali dengan masuknya steroid ini ke dalam sel dan berikatan dengan protein reseptor glukokortikoid sitosolik. Protein-protein ini kemungkinan berasal dari nukleus tapi kemudian bermigrasi ke sitosol karena adanya steroid. Ketika ada steroid yang menempel, kompleks reseptor glukokortikoid-steroid akan mengalami translokasi menuju inti dan menempel pada *Glucocorticoid Response Element* (GREs) pada DNA. Kompleks hormon-reseptor glukokortikoid ini akan mempengaruhi ekspresi gen. Protein yang terjadi mempengaruhi respon glukokortikoid, yang dapat bersifat inhibitor atau stimulator tergantung dari jaringan spesifik yang dipengaruhi (Greenspan, 2000).



Gambar 2.2 Tahap-tahap dalam kerja hormon (Greenspan, 2000).

Efek yang bersifat segera, seperti penekanan umpan balik awal ACTH pituitari terjadi dalam beberapa menit dan terlalu cepat untuk dijelaskan dengan dasar transkripsi gen dan sintesis protein. Masih belum diketahui bagaimana efek-efek tersebut diperantarai. Di antara dugaan mekanisme yang dikemukakan yaitu efek langsung terhadap fungsi membran sel dan reseptor membran untuk hormon

tersebut, atau efek non genomik pada reseptor glukokortikoid klasik yang terikat pada hormon (Chrousos dan Margioris, 2002).

Reseptor glukokortikoid penting dalam fungsi *survival*. Penelitian pada tikus dengan reseptor glukokortikoid yang kurang, mati pada saat lahir dan menderita kelainan perkembangan beberapa organ (Bauer, 1999).

### **2.1.5 Efek Fisiologik Glukokortikoid**

Glukokortikoid pada umumnya menghambat sintesis DNA. Pada sebagian besar jaringan menghambat sintesis RNA dan protein serta mempercepat katabolisme protein. Tetapi sebaliknya sintesis RNA dan protein dalam hepar dirangsang (Greenspan, 2000). Sedikitnya 95 persen aktifitas glukokortikoid dari sekresi adrenokortikal merupakan hasil sekresi kortisol. Beberapa efek glukokortikoid adalah sebagai berikut (Guyton, 2006):

#### **1. Efek Glukokortikoid pada metabolisme karbohidrat**

Hormon ini menyebabkan perangsangan glukoneogenesis, penurunan pemakaian glukosa oleh sel, dan peningkatan konsentrasi glukosa darah dan diabetes adrenal.

#### **2. Efek Glukokortikoid pada metabolisme protein**

Hormon glukokortikoid menyebabkan pengurangan protein sel, peningkatan asam amino darah, berkurangnya pengangkutan asam amino ke sel-sel ekstrahepatik, dan peningkatan pengangkutan asam amino ke sel-sel hati.

### 3. Efek Glukokortikoid pada metabolisme lemak

Hormon ini menyebabkan mobilisasi asam lemak dari jaringan lemak dan peningkatan oksidasi asam lemak di dalam sel. Namun pada penderita yang kelebihan kortisol sering mengalami penumpukan lemak yang berlebihan di daerah dada dan kepalanya. Diduga hal ini disebabkan karena peransangan asupan bahan makanan secara berlebihan, sehingga pada beberapa jaringan tubuh, pembentukan lemak berlangsung lebih cepat daripada mobilisasi dan oksidasinya.

### 4. Efek Glukokortikoid sebagai anti inflamasi

Pada beberapa keadaan, proses inflamasi sering menyebabkan kerusakan melebihi trauma atau penyakit penyebabnya sendiri, seperti pada *arthritis rheumatoid*. Pemberian kortisol dalam jumlah besar biasanya dapat menghambat proses inflamasi ini, atau bahkan dapat membalikkan sebagian besar efeknya segera ketika proses inflamasi mulai terjadi.

### 5. Efek Glukokortikoid pada kondisi Stress

Hampir semua jenis stress, baik fisik maupun neurogenik akan menyebabkan peningkatan sekresi ACTH dengan segera dan bermakna oleh kelenjar hipofisis anterior. Pada kondisi stress, sekresi kortisol oleh korteks adrenal bisa meningkat sampai 20 kali lipat. Pada tikus kondisi normal, konsentrasi rata-rata kortisol plasma adalah 7  $\mu\text{g} / \text{dl}$ , sedangkan pada tikus yang mengalami stress (fraktur pada kedua tulang tibia), konsentrasi kortisol plasma meningkat 6 kali lipat, yaitu menjadi rata-rata 42  $\mu\text{g} / \text{dl}$ .

Peningkatan glukokortikoid ini bermanfaat pada kondisi stress, yaitu berperan dalam menyediakan energi yang berlimpah pada kondisi stress,



dengan cara meningkatkan pengangkutan asam amino dan asam lemak dengan cepat dari cadangan selnya, sehingga dapat digunakan untuk energi dan sintesis senyawa lain. Bersamaan dengan berkurangnya protein di seluruh tubuh, terjadi peningkatan asam amino dalam plasma, demikian juga peningkatan protein hepar dan protein plasma. Diduga glukokortikoid bekerja dengan meningkatkan kecepatan pemecahan protein ekstrahepatik, dengan demikian meningkatkan jumlah asam amino yang tersedia dalam cairan tubuh. Hal ini sebaliknya memungkinkan hati meningkatkan jumlah sintesis protein ekstraseluler dan protein plasma. Jaringan-jaringan yang rusak, yang sementara sangat kekurangan protein, dapat menggunakan asam amino yang baru tersedia untuk membentuk protein baru yang penting untuk kehidupan sel.

## 6. Efek lain glukokortikoid

### a. Efek terhadap alergi

Kortisol menghambat respons inflamasi terhadap reaksi alergi. Dasar reaksi alergi antara antigen dan antibodi tidak dipengaruhi oleh kortisol, dan bahkan beberapa efek sekunder dari reaksi alergi masih terjadi. Tetapi karena respons inflamasi bertanggung-jawab terhadap banyak efek yang berat dan kadangkala mematikan, maka pemberian kortisol dengan efek mengurangi inflamasi dan pelepasan produk inflamasi, dapat menyelamatkan jiwa.

### b. Efek terhadap sel darah dan imunitas pada penyakit infeksi

Kortisol meningkatkan produksi sel-sel darah merah. Bila sekresi kortisol oleh kelenjar adrenal berlebihan, maka seringkali timbul polisitemia, dan

sebaliknya, bila tidak ada sekresi kortisol oleh kelenjar adrenal, maka seringkali akan timbul anemia. Kortisol mengurangi jumlah eosinofil dan limfosit di dalam darah. Pemberian dosis besar kortisol akan menyebabkan atrofi yang bermakna pada jaringan limfoid di seluruh tubuh, yang akan mengurangi keluarnya sel-sel T dan antibodi dari jaringan limfoid.

### 2.1.6 Deksametason

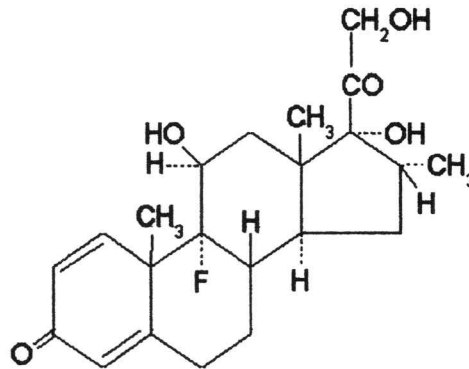
Seperti pada banyak zat alami lainnya, aktivitas steroid-steroid korteks adrenal dapat ditingkatkan dengan mengubah strukturnya. Sekarang tersedia steroid sintetik yang memiliki aktivitas beberapa kali lipat dibandingkan kortisol. Potensi relatif glukokortikoid dan mineralokortikoid pada steroid alami dibandingkan dengan steroid sintetik  $9\alpha$ -fluorokortisol, prednisolon, dan deksametason tercantum di Tabel 2.1 (Ganong, 2005).

Tabel 2.1 Potensi relatif berbagai kortikosteroid dibandingkan dengan kortisol (Ganong, 2005)

Steroid	Aktivitas Glukokortikoid	Aktivitas Mineralokortikoid
Kortisol	1.0	1.0
Kortikosteron	0.3	15
Aldosteron	0.3	3000
Deoksikortikosteron	0.2	100
Kortison	0.7	0.8
Prednisolon	4	0.8
$9\alpha$ -fluorokortisol	10	125
Deksametason	25	~0

Potensi deksametason disebabkan oleh afinitas yang tinggi terhadap reseptor glukokortikoid dan waktu paruh yang panjang (Ganong, 2005). Deksametason merupakan glukokortikoid sintetik dengan efek anti inflamasi yang

kuat dan anti alergi yang sangat kuat, yaitu 7 kali prednisone atau 25 kali hidrokortison. Deksametason praktis tidak memiliki aktifitas retensi Na. Nama kimia deksametason adalah 9 $\alpha$ -Fluoro-11 $\beta$ , 17 $\alpha$ , 21-trihidroksi-16 $\alpha$ -metilpregna-1,4-diena-3,20-dion. Rumus kimia deksametason adalah C<sub>22</sub>H<sub>29</sub>FO<sub>5</sub> (Martindale,1993).



Gambar 2.3 Struktur kimia desametason (Goodman, 2001).

Deksametason digunakan dalam terapi semua kondisi dimana kortikosteroid diindikasikan seperti pada keadaan edema otak, asma berat akut, syok anafilaksik, dan sebagainya kecuali pada defisiensi adrenal karena deksametason hampir tidak memiliki efek retensi natrium sehingga kurang sesuai bila dibandingkan dengan hidrokortison dikombinasikan dengan fludrokortison. Kurangnya efek retensi natrium menyebabkan deksametason cocok digunakan sebagai terapi edema serebral dan supresi sekresi kortikotropin pada hiperplasia adrenal kongenital (Martindale, 1993).

### 2.1.7 Dosis Pemberian Deksametason

Ada dua dosis pemberian deksametason yang dilakukan dalam penelitian ini yaitu dosis tinggi dan dosis rendah. Dosis tinggi deksametason yang digunakan

1 mg / 200 gBB / hari (Leung, 1985). Sedangkan dosis rendah deksametason adalah 0,1 mg / 200 gBB / hari (Malgor, 1987)

## 2.2 Eritrosit

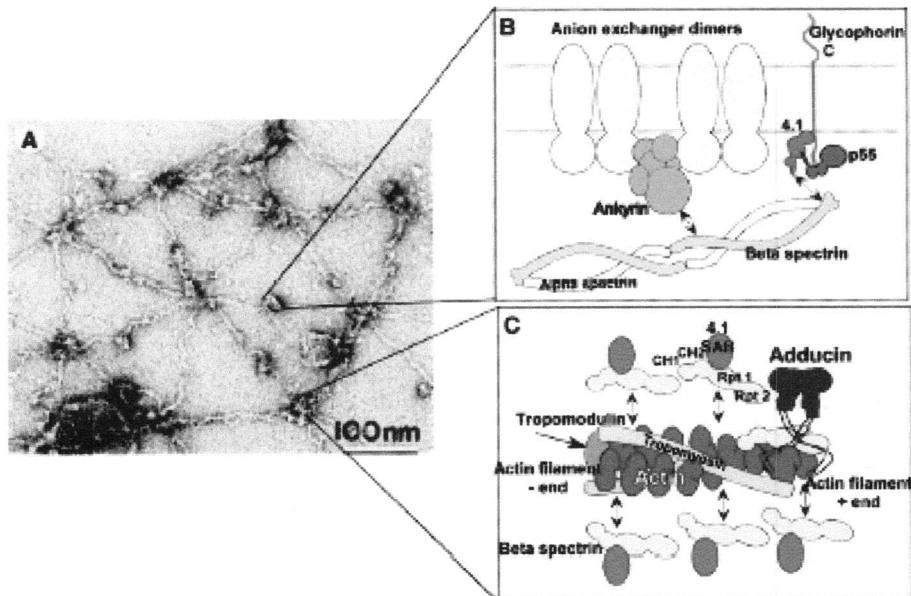
Fungsi utama eritrosit adalah mengangkut  $O_2$  ke jaringan dan mengembalikan  $CO_2$  dari jaringan ke paru-paru. Untuk melaksanakan tugas ini eritrosit mengandung Hb. Molekul-molekul Hb terdiri atas 2 pasang rantai polipeptida (globin) dan 4 kelompok heme, masing-masing mengandung sebuah atom besi. Konfigurasi ini memungkinkan pertukaran gas yang sesuai (Price, 2006).

Eritrosit berbentuk cakram bikonkaf dengan diameter kurang lebih 8  $\mu m$ , tebal bagian tepi 2  $\mu m$  dan ketebalannya berkurang di bagian tengah menjadi hanya 1  $\mu m$  atau kurang. Volume rata-rata 90 sampai 95  $\mu m^3$ , tidak mengandung inti sel dan organel-organel sitoplasma lain (Price, 2006). Umur eritrosit manusia kurang lebih 120 hari (Ganong, 2005). Pada tikus penelitian dengan menggunakan label  $^{59}Fe$ , menunjukkan usia eritrosit 55 hari dan untuk proses *erythropoiesis* membutuhkan waktu 5 - 10 hari. *Erythropoiesis* terjadi pada sumsum tulang dan lien (Clark, 1988).

Pembentukan eritrosit pada manusia terjadi pertengahan trimester pertama kehamilan terutama di hati. Kemudian fase berikutnya sampai janin lahir pada sumsum tulang yang merupakan organ utama yang memproduksi eritrosit. Pengaturan *erythropoiesis* berdasarkan mekanisme umpan balik. Penurunan *erythropoiesis* terjadi jika kadar eritrosit dalam sirkulasi meningkat diatas normal dan sebaliknya meningkat jika terjadi anemia (Guyton, 2006).

### 2.2.1 Membran eritrosit

Membran eritrosit terdiri dari membran plasma yang merupakan lapisan *lipid bilayer* dan sitoskeleton. Sitoskeleton terdiri dari protein struktural dan bersifat kontraktile. Protein penyusun sitoskeletal membran eritrosit terdiri dari *spectrin*, *ankyrin*, *tropomodulin*, *actin*, *tropomyosin*, *adducin*, *paladin*, protein 4.1, protein 4.9 (*dematin*) dan protein 55. Pada permukaan membran terdapat antigen permukaan yang terikat pada *glycophorin*. Terdapat protein integral yang menembus membran *lipid bilayer* yang berfungsi sebagai kanal ion. Kanal ion berperan sebagai pertukaran ion transmembran. Kanal ion itu antara lain anion *exchanger* (band 3),  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  *exchanger*,  $\text{K}^+/\text{Cl}^-$  *cotransport*,  $\text{K}^+/\text{Na}^+/\text{Cl}^-$  *cotransport*, pompa natrium dan  $\text{Na}^+/\beta$  amino *cotransport*. Fungsi kanal ion ini untuk mengatur transpor membran yang diperlukan untuk mengatur pengangkutan oksigen melalui membran dan mengatur volume sel eritrosit (Bennett, 2001).



Gambar 2.4 Struktur membran eritrosit (Bennet, 2001)

Pada domain sitoplasmik band 3 terikat secara reversibel Hb dan enzim-enzim glikolisis seperti gliseraldehid 3-fosfat dehidrogenase, aldose, fosfofruktokinase. Jika terjadi kelainan pada enzim ini akan mengakibatkan perubahan bentuk eritrosit (Bennett, 2001).

### 2.2.2 Metabolisme Energi

Sumber energi eritrosit yang bisa dipakai oleh eritrosit adalah glukosa, karena di dalamnya tidak didapatkan mitokondria. Meskipun tidak mempunyai mitokondria, ia memiliki glukosa dan enzim-enzim metabolisme glukosa untuk menghasilkan glukosa. Glukosa masuk ke dalam eritrosit tidak tergantung insulin meski di membran selnya terdapat reseptor insulin (Beutler, 1995)

Glukosa di dalam eritrosit akan dimetabolisme melalui dua mekanisme utama, yaitu :

#### 1. Jalur *Embden Mayerhoff*

Jalur ini dipakai eritrosit untuk menghasilkan ATP (Beutler, 1995). Proses berjalan secara anaerob dan menghasilkan asam laktat. Untuk setiap mol glukosa akan dihasilkan 2 mol ATP. ATP yang terbentuk digunakan untuk memelihara volume, bentuk dan kelenturan eritrosit. Eritrosit mempunyai tekanan lima kali plasma dan permeabilitas membran yang memudahkan pergerakan natrium dan kalium. Untuk menyeimbangkan muatan sel, perlu banyak digunakan pompa natrium dan ini membutuhkan satu mol ATP untuk menggerakkan 3 ion natrium keluar dan 2 ion K masuk ke dalam sel (Voet, 1995)

Terdapat kekhasan pada metabolisme glukosa eritrosit, yaitu adanya jalur intermedia glikolitik yang disebut sebagai *Rapoport-Luebering shunt*. Pada jalur ini, 1,3 difosfoglisarat tidak diubah menjadi 3 fosfoglisarat tetapi diubah menjadi 2,3 difosfoglisarat (2,3 DPG) yang berfungsi untuk menggeser kurva disosiasi oksihemoglobin ke arah kanan.

## 2. Jalur Heksosa Monofosfat

Eritrosit memetabolisme glukosa melalui jalur ini kira-kira sebesar 5%. Pada jalur ini glukosa-6-fosfat diubah menjadi 6-fosfoglukonat dan kemudian menjadi ribose-5-fosfat. Pada jalur ini dihasilkan NADPH yang berguna untuk mengikat glutathion untuk menjaga keutuhan gugus sulfhidril (-SH) dalam sel, termasuk yang di dalam Hb dan membran eritrosit. NADPH juga oleh methemoglobin reduktase lainnya untuk memelihara besi Hb dalam kondisi tereduksi yang aktif secara fungsional (Voet, 1995)

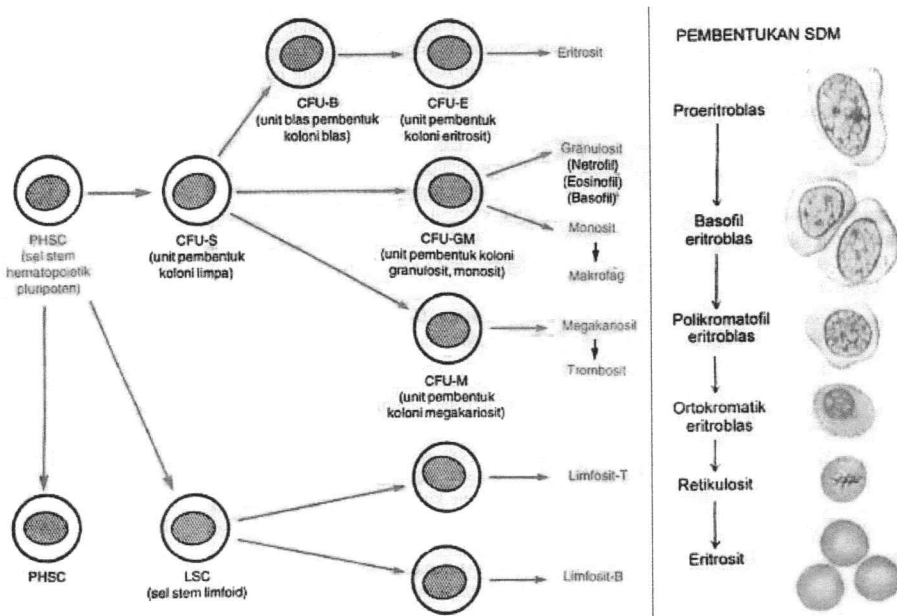
### 2.2.3 Produksi Eritrosit

Oksigen merupakan faktor utama yang merangsang proses pembentukan eritrosit (*erythropoiesis*). Kemampuan fungsional eritrosit untuk mentransport oksigen ke jaringan berhubungan dengan kebutuhan oksigen jaringan. Setiap keadaan yang menyebabkan jumlah oksigen yang ditranspor ke jaringan berkurang akan meningkatkan kecepatan pembentukan eritrosit. Keadaan yang dapat mempengaruhi *erythropoiesis* adalah tekanan oksigen atmosfer rendah pada ketinggian tertentu, penyakit kardio-pulmonal, volume darah yang rendah, konsentrasi Hb rendah (anemia) dan afinitas  $O_2$ -Hb (Guyton, 2006).

Produksi eritrosit mengalami berbagai tahap diferensiasi sel (Beutler, 1995; Guyton, 2006) :

1. Sel stem hemopoietik pluripoten (*erythroid cells*), merupakan asal dari seluruh sel-sel darah sirkulasi, yang mengalami pembelahan (proliferasi) membentuk berbagai macam sel darah tepi. Ditemukan pada sumsum tulang. Sel stem dapat berdiferensiasi menjadi *colony forming units-Germinal* (CFU-Gemm) dengan bantuan interleukin-6 (IL- 6), IL-11, *stem cell factor* (SCF) dan *granulocyte macrophage colony stimulating factor* (GM-CSF). Pada tahap ini masih belum spesifik apakah sel akan menjadi eritrosit.
2. *Erythroid Progenitor*, pada tahap ini mulai dikenali sebagai sel eritroid *immatur*. Pada sumsum tulang manusia ada 2 bentuk sel yaitu *Burst forming units - Erythroid* (BFU-E) dan setelah 6 - 7 hari akan berubah menjadi *Colony forming units - Erythroid* (CFU-E). Proses diferensiasi ini membutuhkan sitokin yaitu IL-3, SCF dan IL-9. Pada tahap CFU-E sel eritrosit mulai mempunyai reseptor EPO sehingga proses maturasi eritrosit dapat lebih cepat.
3. *Erythroid Precursors*, pada tahap ini mulai dari bentukan proeritroblas yang akan membelah beberapa kali sampai membentuk banyak eritrosit yang *matur*. Sel generasi pertama disebut basofil eritroblas, sel menggumpal sedikit Hb. Pada tahap berikutnya sel dipenuhi Hb dan inti memadat menjadi kecil dan sisanya direabsorpsi retikulum endoplasma, dimana pada tahap ini disebut retikulosit. Tahap retikulosit sel akan berjalan dari sumsum tulang ke kapiler setelah 1-2 hari menjadi eritrosit yang *matur*.

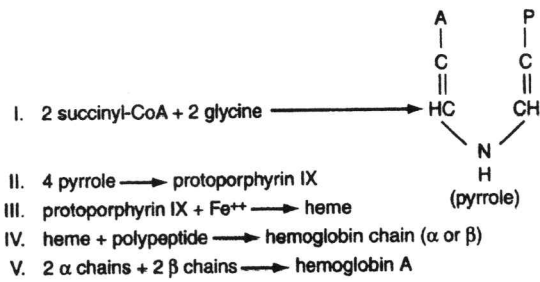




Gambar 2.5 Pembentukan eritrosit (*erythropoiesis*)(Guyton, 2006).

Sintesis Hb dimulai dalam tahap proeritroblas dan kemudian dilanjutkan pada stadium retikulosit. Pada retikulosit terdapat sedikit Hb. Pembentukan Hb diawali dengan suksinil-KoA, yang dibentuk dalam siklus krebs akan berikatan dengan glisin untuk membentuk molekul pirol. Kemudian empat pirol bergabung untuk membentuk protoporfirin IX, yang kemudian bergabung dengan besi untuk membentuk molekul heme. Setiap molekul heme bergabung dengan rantai polipeptida panjang, yang disebut globin. Globin disintesis oleh ribosom, membentuk suatu subunit Hb yang disebut rantai Hb. Setiap rantai ini mempunyai berat molekul kira-kira 16.000, selanjutnya keempat molekul ini berikatan satu sama lain secara longgar membentuk Hb yang lengkap.

Karena setiap rantai mempunyai sekelompok prostetik heme, maka terdapat empat atom besi dalam setiap molekul Hb, masing-masing dapat berikatan dengan 1 molekul oksigen, total membentuk 4 molekul oksigen (atau 8 atom oksigen) yang dapat diangkut oleh setiap molekul Hb (Guyton, 2006).



Gambar 2.6 Sintesis Hb (Guyton, 2006)

Hb merupakan unsur terpenting dalam plasma eritrosit. Molekul Hb terdiri dari globin, protoporfirin dan besi (Fe). Globin dibentuk sekitar ribosom sedangkan protoporfirin dibentuk sekitar mitokondria. Besi didapat dari transferin. Pada permulaan eritroblas terdapat reseptor transferin. Gangguan dalam pengikatan besi untuk membentuk Hb akan mengakibatkan terbentuknya eritrosit dengan sitoplasma yang kecil (mikrositer) dan kurang mengandung Hb di dalamnya (hipokrom). Tidak berhasilnya sitoplasma sel eritrosit berinti mengikat Fe untuk pembentukan Hb dapat disebabkan oleh rendahnya kadar Fe dalam darah dan oleh rendahnya kadar transferin dalam darah. Hal ini dapat dimengerti karena eritroblas maupun retikulosit hanya memiliki reseptor transferin bukan reseptor Fe (Reksodiputro, 1994).

### A. Retikulosit

Retikulosit merupakan eritrosit imatur tidak berinti yang mengandung sisa-sisa RNA dalam sitoplasmanya. Pada pembentukan eritrosit, eritroblas mengalami ekspulsi inti. Mengawali ekspulsi inti, filamen antara dan band marginal mikrotubulus menghilang, bersamaan dengan perubahan susunan skeleton membran. Ekspulsi inti invitro berlangsung cepat, dalam beberapa menit. In vivo, ekspulsi inti terjadi pada saat eritroblas masih menjadi bagian pulau

eritroblastik, atau inti menghilang pada saat melewati dinding sinus sumsum tulang. Inti tidak dapat melewati pembukaan yang kecil, tetap berada di sumsum tulang. Pada kasus lain, inti yang keluar dimakan oleh makrofag (Beutler, 1995).

Selama tahap retikulosit, sel-sel berjalan dari sumsum tulang masuk ke dalam kapiler darah dengan cara diapedesis (terperas melalui pori-pori membran kapiler). Pada saat masuk sirkulasi, retikosit mempertahankan mitokondria, sejumlah kecil ribosom, sentriol, dan dan sisa badan golgi. Retikulosit tidak memiliki retikulum endoplasma. Pewarnaan menggunakan *brilliant cresyl blue* atau *new methylene blue* menghasilkan agregasi ribosom, mitokondria, dan organela sitoplasmik yang lain (Beutler, 1995). Sel nampak memiliki jala-jala atau retikulum di dalamnya, oleh karena itu disebut retikulosit. Bahan basofilik yang tersisa dalam retikulosit normalnya akan menghilang dalam waktu 1 sampai 2 hari, dan sel kemudian menjadi eritrosit matur. Karena waktu hidup retikulosit ini pendek, maka konsentrasinya diantara seluruh sel darah merah dalam keadaan normal kurang dari 1 persen (Guyton, 2006). Peningkatan retikulosit dalam darah menunjukkan adanya peningkatan aktifitas sumsum tulang, sedangkan penurunan atau tidak adanya retikulosit menunjukkan adanya kegagalan sumsum tulang (Price, 2006).

Semua langkah sintesis Hb terjadi di dalam sumsum tulang. Langkah-langkah akhir berlanjut setelah eritrosit imatur dilepas ke dalam sirkulasi sebagai retikulosit (Price, 2006).

## B. Faktor-faktor yang mempengaruhi *erythropoiesis*

### 1. *Erythropoietin (EPO)*

Produksi eritrosit diatur oleh hormon *erythropoietin (EPO)*, suatu glikoprotein yang diproduksi oleh sel peritubuler pada ginjal dan sisanya oleh hati. EPO merupakan glikoprotein dengan berat molekul 34.000. Bila EPO ini tidak ada, maka pengaruh keadaan hipoksia sedikit sekali dalam perangsangan produksi sel darah merah (Guyton, 2006) dan terjadilah anemia. Mencit dengan gangguan gen yang mengkode EPO dan reseptor EPO mati pada 13,5 hari kehamilan karena kekurangan eritrosit. BFU-E dan CFU-E dapat diisolasi dari *fetal liver* mencit ini, namun sel yang kekurangan reseptor EPO tidak dapat berkembang menjadi eritrosit dewasa (Von Lindern, 1999).

EPO berperan pada tahap akhir differensiasi dimana EPO berperan dalam proses peningkatan *uptake* glukosa, sintesis reseptor transferrin, peningkatan *uptake* besi, sintesa haemoglobin, berperan pada proses pembentukan protein membran (band 3 dan protein 4.1) (Beutler, 1995).

EPO merangsang proliferasi dan differensiasi eritroid melalui interaksi dengan reseptor-reseptor EPO khusus pada progenitor sel darah merah. EPO juga mempengaruhi *release* retikulosit dari sumsum tulang. EPO endogen diproduksi oleh ginjal sebagai respon terhadap hipoksia jaringan. Bila terjadi anemia, lebih banyak lagi EPO diproduksi oleh ginjal dan memberi sinyal pada sumsum tulang untuk memproduksi lebih banyak eritrosit. Hasil perbaikan anemia ini menunjukkan bahwa respon sumsum tulang tidak dirusak oleh defisiensi nutrisi eritrosit (terutama defisiensi zat besi), kelainan-

kelainan sumsum tulang primer, atau penekanan sumsum tulang dari obat atau penyakit-penyakit kronik (Chrousos dan Margioris, 2002).

## 2. Nutrisi

Sel-sel sumsum tulang merupakan sel yang tumbuh dan bereproduksi paling cepat di seluruh tubuh, karena terus menerus harus memenuhi kebutuhan akan sel darah merah. Oleh karena itu, pematangan dan kecepatan produksi dipengaruhi oleh keadaan nutrisi seseorang.

Dua vitamin yang khususnya penting untuk pematangan akhir sel darah merah adalah vitamin B<sub>12</sub> dan asam folat. Keduanya bersifat penting untuk sintesis DNA karena masing-masing dengan cara yang berbeda dibutuhkan untuk pembentukan timidin trifosfat, salah satu pembangun penting dari DNA. Oleh karena itu, kurangnya vitamin B<sub>12</sub> atau asam folat dapat menyebabkan penurunan DNA dan akibatnya kegagalan pematangan dan pembelahan inti. Selanjutnya, sel-sel eritroblastik pada sumsum tulang, karena gagal berproliferasi secara cepat, terutama akan menghasilkan sel darah merah yang lebih besar dari normal, disebut makrosit, yang mempunyai membran sangat tipis, dan seringkali berbentuk tidak teratur, besar, dan oval, berbeda dengan bentuk lempeng bikonkaf yang biasa. Terbentuknya sel yang abnormal ini karena ketidakmampuan sel-sel untuk mensintesis DNA dalam jumlah yang memadai akan memperlambat reproduksi sel-sel, tetapi tidak menghalangi kelebihan pembentukan RNA oleh DNA dalam sel-sel yang berhasil diproduksi. Sebagai akibatnya, jumlah RNA dalam setiap sel akan melebihi normal, menyebabkan produksi Hb sitoplasmik dan bahan-bahan lainnya berlebihan, yang membuat sel menjadi membesar. Ternyata, akibat

abnormalitas semua DNA sel, maka komponen struktural membran sel dan sitoskeleton juga mengalami malformasi, yang menghasilkan bentuk abnormal dan terutama meningkatkan kerapuhan membran sel. Sel yang berbentuk kurang baik ini, setelah masuk dalam sirkulasi, secara normal mampu mengangkut oksigen, tetapi kerapuhannya menyebabkan sel tersebut memiliki masa hidup yang pendek, yaitu setengah sampai sepertiga normal. Sehingga dikatakan bahwa defisiensi vitamin B<sub>12</sub> atau asam folat dapat menyebabkan kegagalan pematangan dalam *erythropoiesis* (Guyton, 2006).

Selain kedua vitamin diatas, besi merupakan nutrisi yang penting dalam *erythropoiesis* untuk sintesis Hb (Guyton, 2006). Dalam keadaan normal, tubuh orang dewasa rata-rata mengandung 4-5 gram besi, tergantung pada jenis kelamin dan ukuran tubuhnya. Lebih dari dua pertiga besi terdapat dalam Hb. Besi dilepas dengan semakin tua dan matinya sel dan diangkut melalui transferin plasma ke sumsum tulang untuk *erythropoiesis*.

Walaupun dalam diet rata-rata mengandung 10 sampai 20 mg besi, hanya sekitar 5% hingga 10% (1-2mg) yang sebenarnya diabsorbsi. Pada saat persediaan besi berkurang, maka lebih banyak besi diabsorbsi dari diet. Besi yang dicerna diubah menjadi besi ferro dalam lambung dan duodenum serta diabsorbsi dari duodenum dan jejunum proksimal. Kemudian besi diangkut oleh transferin plasma ke sumsum tulang untuk sintesis Hb atau ke tempat penyimpanan di jaringan (Price, 2006).

Gambaran unik dari molekul transferin adalah molekul ini berikatan secara kuat dengan reseptor pada membran sel eritroblas dengan cara

endositosis. Di sini, transferin mengirimkan besi secara langsung ke mitokondria, tempat dimana heme disintesis. Pada orang-orang yang dalam darahnya tidak terdapat transferin dalam jumlah cukup, maka kegagalan pengangkutan besi ke eritroblas akan menyebabkan anemia hipokrom yang berat (Guyton, 2006).

#### 2.2.4 Karakter eritrosit

Hitung jenis sel darah merah pada sediaan hapus menentukan karakteristik morfologis darah serta jumlah berbagai sel darah. Eritrosit yang terlihat pada sediaan hapus dapat ditandai menurut berbagai ukuran dan bentuknya. *Anisositosis* menyatakan variasi ukuran sel yang abnormal. Variasi bentuk yang abnormal disebut *poikilositosis* dan menunjukkan sel-sel yang bentuknya seperti tetesan air mata, buah pear, topi dan oval. *Poikilositosis* dan *anisositosis* dapat menyatakan adanya gangguan *erythropoiesis*.

*Polikromasia* adalah istilah yang digunakan jika sel-sel memiliki distribusi warna yang berbeda. *Normokromia* menggambarkan konsentrasi Hb yang normal dalam sel. *Hipokromia* memperlihatkan suatu sel yang pucat, menggambarkan penurunan konsentrasi Hb seperti yang terlihat pada anemia defisiensi besi.

Komponen utama eritrosit adalah Hb. Konsentrasi Hb darah diukur berdasarkan intensitas warnanya menggunakan fotometer dan dinyatakan dalam gram Hb / seratus mililiter darah (g / 100 ml) atau gram / desiliter (g / dl).

Hct menunjukkan volume darah lengkap yang terdiri dari eritrosit. Pengukuran ini merupakan persentase eritrosit dalam darah lengkap setelah

spesimen darah disentrifugasi, dan dinyatakan dalam milimeter kubik *packed cell* / 100 ml darah atau dalam volume / dl.

Hasil dari hitung sel darah merah, konsentrasi Hb, dan Hct digunakan untuk menghitung indeks eritrosit, yang mencerminkan ukuran eritrosit, kadar Hb dan konsentrasinya. Pembagian Hct berdasarkan jumlah eritrosit akan menghasilkan volume eritrosit rata-rata (*mean corpuscular volume, MCV*). Ini adalah pengukuran besarnya sel yang dinyatakan dalam mikrometer kubik, dengan rentang nilai normal dari 81 hingga 96  $\mu\text{m}^3$ . Eritrosit dalam batas-batas tersebut disebut *normositik*, yaitu sel berukuran normal. MCV yang kurang dari rentang itu disebut *mikrositik* sedangkan yang lebih disebut *makrositik*.

Konsentrasi Hb eritrosit rata-rata (*mean corpuscular hemoglobin concentration, MCHC*) mengukur jumlah Hb dalam 100 ml (1 dl) eritrosit *packed*. MCHC didapat dengan membagi ukuran Hb dengan Hct dan dinyatakan dalam gram / 100ml (g / dl). Batas normal MCHC adalah 30-36 g / 100 ml darah, disebut *normokromik*. Hasil yang kurang dari 30 g / 100 ml adalah *hipokromik*.

Hemoglobin eritrosit rata-rata (*mean corpuscular hemoglobin, MCH*) mengukur jumlah Hb yang terdapat dalam satu eritrosit, dan ditentukan melalui pembagian jumlah Hb dalam 1000 ml darah dengan jumlah eritrosit permilimeterkubik darah. MCH dinyatakan dalam pikogram Hb / eritrosit. Nilai normal adalah sekitar 27-31 pg / eritrosit (Price, 2006).

### 2.2.5 Destruksi eritrosit

Dengan berjalannya waktu, sistem metabolisme eritrosit secara progresif menjadi kurang aktif. Enzim-enzim pada eritrosit tidak dapat diganti, sampai sel



tidak mampu. Mekanisme destruksi eritrosit terjadi dengan beberapa cara antara lain (Ganong, 2005; Guyton, 2006) :

1. Fragmentasi, yaitu eritrosit kehilangan beberapa bagian membran yang sering diikuti oleh kehilangan isi sel, termasuk Hb. Fragmentasi dapat terjadi karena berbagai hal misalnya trauma fisik, panas, tekanan pada mikrosirkulasi.
2. Lisis osmotik yaitu eritrosit cenderung menarik air, sehingga bila terjadi kelainan metabolisme atau struktur eritrosit menyebabkan eritrosit mudah lisis.
3. Eritrofagositosis, yaitu eritrosit difagosit oleh sel monosit, neutrofil atau makrofag.
4. Sitolisis, dengan bantuan komplemen yaitu adanya interaksi antigen dan antibodi yang terdapat di permukaan eritrosit, maka aktivasi komplemen akan mengakibatkan kerusakan membran sel eritrosit sehingga terjadi lisis.
5. Denaturasi Hb hal ini sering terlihat pada defisiensi enzim G6PD.

#### **2.2.6 Anemia**

Menurut definisi, anemia adalah berkurangnya hingga dibawah nilai normal jumlah eritrosit, kuantitas Hb dan Hct per 100 ml darah (Price, 2006). Anemia dapat diklasifikasikan pertama, berdasarkan faktor-faktor morfologik eritrosit dan indeks-indeksnya dan kedua, berdasarkan etiologi. Pada klasifikasi morfologik anemia, mikro atau makro menunjukkan ukuran eritrosit dan kromik untuk menunjukkan warnanya. Terdapat tiga kategori anemia bila ditinjau dari morfologinya (Price, 2006):

### 1. Anemia normokromik normositer

Eritrosit memiliki ukuran dan bentuk normal serta mengandung jumlah Hb normal (MCV dan MCHC normal atau normal rendah). Penyebab anemia jenis ini adalah kehilangan darah akut, hemolisis, penyakit kronik yang meliputi infeksi, gangguan endokrin, gangguan ginjal, kegagalan sumsum tulang, dan penyakit-penyakit infiltratif metastatik pada sumsum tulang.

### 2. Anemia normokromik makrositer

Eritrosit lebih besar dari normal tetapi konsentrasi Hb normal (MCV meningkat, MCHC normal). Keadaan ini disebabkan oleh terganggunya atau terhentinya sintesis asam deoksiribonukleat (DNA) seperti yang ditemukan pada defisiensi B<sub>12</sub> atau asam folat atau keduanya. Anemia normokromik dapat juga terjadi pada kemoterapi kanker karena agen-agen mengganggu sintesis DNA.

### 3. Anemia hipokromik mikrositer

Eritrosit lebih kecil dari normal dan mengandung Hb dalam jumlah yang kurang dari normal (penurunan MCV dan penurunan MCHC). Keadaan ini umumnya mencerminkan insufisiensi sintesis heme atau kekurangan zat besi, seperti pada anemia defisiensi besi, keadaan sideroblastik, dan kehilangan darah kronis, atau gangguan sintesis globin, seperti pada thalasemia.

Beberapa tipe anemia berdasarkan etiologinya adalah sebagai berikut (Guyton, 2006):

1. Anemia akibat kehilangan darah.

Mekanisme yang terjadi setelah tubuh mengalami perdarahan yang cepat adalah tubuh akan mengganti cairan plasma dalam waktu 1 sampai 3 hari, namun hal ini akan menyebabkan konsentrasi sel darah merah menjadi rendah. Pada kehilangan darah yang kronik, penderita seringkali tidak dapat mengabsorpsi cukup besi dari usus halus untuk membentuk Hb secepat darah yang hilang. Sehingga terbentuk sel darah merah yang mengandung sedikit sekali Hb, menimbulkan keadaan anemia hipokromik mikrositik.

2. Anemia Aplastik

Aplasia sumsum tulang berarti tidak berfungsinya sumsum tulang. Seperti pada orang yang terpapar sinar gamma akibat ledakan bom cenderung menderita kerusakan sumsum tulang yang menyeluruh, dalam beberapa minggu diikuti dengan anemia yang mematikan. Demikian juga terapi sinar-x yang berlebihan, bahan kimia industri tertentu bahkan pada penderita yang sensitif obat-obatan bisa mengakibatkan efek yang sama.

3. Anemia megaloblastik.

Apabila terjadi kekurangan salah satu dari vitamin B<sub>12</sub>, asam folat dan faktor-faktor intrinsik dari mukosa lambung, maka dapat memperlambat produksi eritroblas dalam sumsum tulang. Karena eritroblas tidak dapat berproliferasi secara cepat untuk membentuk sel darah merah dalam jumlah normal, maka sel-sel yang terbentuk menjadi

terlalu besar dan berbentuk aneh (megaloblas). Sel ini membrannya rapuh dan mudah lisis. Hal ini terjadi pada atrofi mukosa lambung pada anemia pernisirosa, gastrektomi total, *intestinal sprue*, dimana asam folat dimana asam folat, vitamin B<sub>12</sub>, dan senyawa vitamin B lainnya sedikit sekali diabsorpsi.

#### 4. Anemia hemolitik

Eritrosit pada penyakit hemolitik bersifat rapuh, mudah robek sewaktu melewati kapiler, terutama sewaktu melewati limpa sehingga masa hidup eritrosit sangat pendek dan menimbulkan anemia yang parah. Anemia jenis ini terdapat pada sferositosis herediter dan anemia sel sabit. Hemolisis juga bisa disebabkan oleh reaksi transfusi, malaria dan reaksi terhadap obat-obatan.

### 2.3. Efek glukokortikoid terhadap produksi eritrosit

#### 2.3.1 Efek glukokortikoid dosis rendah pada produksi eritrosit

Penelitian *in vitro* (Golde, 1976) glukokortikoid meningkatkan pembentukan koloni eritroid pada *murine* dan meningkatkan proliferasi sel eritroid (Udupa, 1986) pada saat jumlah EPO terbatas (Bauer, 1999).

Glukokortikoid banyak dikeluarkan pada saat stress untuk menjaga homeostasis, seperti pada keadaan kehilangan darah, hemolisis, berada pada ketinggian dan pada eritroleukemia dimana fungsi eritrosit berkurang (Bauer, 1999). Glukokortikoid bersama dengan *Stem Cell Factor* (SCF) dan EPO dapat merangsang stress *erythropoiesis*, seperti halnya pada penelitian *in vitro* ketiganya diperlukan untuk ekspansi eritroblas immatur (Von Lindern, 1999).

Stress *erythropoiesis* pada mencit terutama terjadi di lien dan sedikit terjadi di sumsum tulang ( Broudy, 1996).

Injeksi deksametason dosis rendah ( 0,1 mg / 200 gBB ) selama 10 hari merangsang *erythropoiesis* pada tikus anemia karena nefrektomi dengan cara meningkatkan produksi EPO pada masa ginjal yang tersisa. Selain itu, efek permisif deksametason meningkatkan sensitifitas sel yang responsif EPO pada sumsum tulang. Peningkatan *erythropoiesis* dibuktikan dengan peningkatan jumlah absolut prekursor sel eritroid per miligram sumsum tulang. Sedangkan pada sirkulasi didapatkan peningkatan jumlah retikulosit, peningkatan kadar Hb dan Hct ( Malgor, 1987). Pada penelitian secara *in vitro*, deksametason dosis rendah meningkatkan jumlah BFU-E dari pasien *sickle cell anemia*. Masing-masing BFU-E tampak lebih besar dan mengandung lebih banyak subkoloni (Steinberg, 1981).

Glukokortikoid merangsang *erythropoiesis* secara tidak langsung dengan meningkatkan produksi EPO di ginjal (Fisher ,1998 cit Bauer, 1999). EPO berperan pada tahap akhir differensiasi dimana EPO berperan dalam proses peningkatan *uptake* glukosa, sintesis reseptor transferrin, peningkatan *uptake* besi, sintesa Hb, berperan pada proses pembentukan protein membran (band 3 dan protein 4.1 ) (Krantz, 1991; Beutler, 1995). Penelitian *in vitro*, penambahan EPO pada kultur sel anemia menyebabkan peningkatan differensiasi sel eritroid menjadi eritroblas hingga terbentuk retikulosit dalam 48-60 jam, sintesis Hb dan pembentukan protein membran eritrosit (band 3 dan protein 4.1 ) terjadi dalam 12 jam. Sedangkan dalam waktu 6 jam permulaan dari transkripsi m-RNA globin dapat diidentifikasi. Peningkatan *transferrin binding site* terjadi dalam waktu 6

jam, sedangkan peningkatan *uptake* glukosa terjadi dalam 2-4 jam. Glukosa diperlukan untuk pembentukan ATP. ATP ini menyediakan energi yang digunakan untuk memelihara volume, bentuk dan kelenturan eritrosit (Voet, 1995), sehingga eritrosit tidak mudah lisis. Penambahan EPO pada CFU-E *in vitro* menyebabkan ekspresi yang cepat dari m-RNA  $\alpha$  dan  $\beta$ - globin, segera setelah itu akan terjadi sintesis Hb (Beutler, 1995). Penambahan EPO pada CFU-E juga meningkatkan koloni eritroblas dari 8 menjadi 64 dalam waktu 2 hari pada tikus (Krantz, 1991). EPO juga berperan melindungi sel eritroid dari apoptosis pada saat akhir maturasi eritrosit (Kolbus, 2003) dengan cara upregulasi protein antiapoptosis Bcl-X(L) (Dolznig, 2002). Tanpa EPO, apoptosis progenitor eritroid berlangsung cepat dan sel mati, sedangkan jika ada EPO proses ini dihambat dan CFU-E *survive* sampai menjadi eritrosit (Krantz, 1991).

Pengaruh glukokortikoid pada hepar adalah meningkatkan sintesis protein, termasuk transferin (Chou, 1983; Guyton, 2006). Transferin berfungsi mengangkut besi yang dibutuhkan untuk sintesis heme di eritroblas pada proses sintesis Hb. Salah satu penyebab ketidakberhasilan eritroblas mengikat besi karena rendahnya kadar transferin dalam darah. Hal ini dapat dimengerti karena sel eritroblas maupun retikulosit hanya memiliki reseptor transferin bukan reseptor Fe (Reksodiputro, 1994).

### **2.3.2 Efek glukokortikoid dosis tinggi pada produksi eritrosit**

Pada *mice* yang mengalami hipoksia berat pada hari ke 6 dijumpai penurunan kadar EPO 48% dari kontrol (Fisher, 1977). Hipoksia menyebabkan peningkatan glukokortikoid yang sangat tinggi dalam darah (Bauer, 1999).

Penurunan produksi EPO dapat menurunkan *erythropoiesis* pada sumsum tulang, sehingga jumlah retikulosit yang keluar dari sumsum tulang menurun (Szygula, 1990). Penurunan EPO menyebabkan penurunan pada *uptake* glukosa, sintesis reseptor transferin, *uptake* besi, sintesis Hb, dan proses pembentukan protein membran eritrosit (band 3 dan protein 4.1) (Krantz, 1991; Beutler, 1995). Disamping itu, peran EPO dalam melindungi sel eritroid dari apoptosis pada saat akhir maturasi eritrosit (Kolbus, 2003), juga berkurang. Sedangkan efeknya pada hepar meningkatkan sintesis transferin dengan meningkatkan m-RNA transferin (MC Knight, 1980). Namun peningkatan sintesis transferin yang tidak diikuti peningkatan sintesis reseptor transferin oleh karena EPO yang menurun, tidak akan meningkatkan sintesis Hb. Selain itu, deksametason dosis tinggi menghambat translasi dari  $\alpha$  dan  $\beta$ -globin (Papaconstantinou, 1983), sehingga menurunkan sintesis Hb.

Pemaparan glukokortikoid dosis tinggi dalam waktu yang lebih pendek nampak pada kultur dari fetal liver selama 2 hari yang diperoleh dari *pregnant mice* yang diberi deksametason dosis tinggi 24 jam sebelumnya menunjukkan penghambatan pembentukan koloni eritroid melalui penurunan proliferasi *fetal liver* CFU-E (Leung, 1985).

Hasil yang berbeda didapat dari penelitian Bauer (1999), yang dilakukan pada *wild type mice* dan *GR<sup>dim/dim</sup> mice* (*mice* dengan *Glucocorticoid Receptor* yang mengalami gangguan pengikatan DNA dan transaktivasi, namun masih dapat mengalami transrepressi). Pemaparan pada kondisi hipoksia dilakukan selama 2 hari pada *wild type mice* dan *GR<sup>dim/dim</sup> mice*. Glukokortikoid sangat meningkat di sirkulasi (22-35  $\mu\text{g/dL}$ ) dibandingkan keadaan basal (3-7  $\mu\text{g/dL}$ )

baik pada *hypoxic wild wild type mice* maupun *hypoxic GR<sup>dim/dim</sup> mice* dibandingkan kontrol. Pada *hypoxic wild type mice* terjadi peningkatan jumlah eritrosit, kadar Hb, Hct dibandingkan *normoxic wild wild type mice*, namun pada *hypoxic GR<sup>dim/dim</sup> mice* tidak didapatkan peningkatan jumlah eritrosit, kadar Hb, dan Hct. Hasil ini juga dikonfirmasi dengan kenaikan CFU-E lien pada *hypoxic wild type mice* namun tidak pada *hypoxic GR<sup>dim/dim</sup> mice*. Kondisi ini menunjukkan bahwa adaptasi yang cepat terhadap stress hipoksia dengan peningkatan jumlah eritrosit, kadar Hb dan Hct pada darah tepi tidak dapat terjadi tanpa peran dari glukokortikoid dan reseptornya.

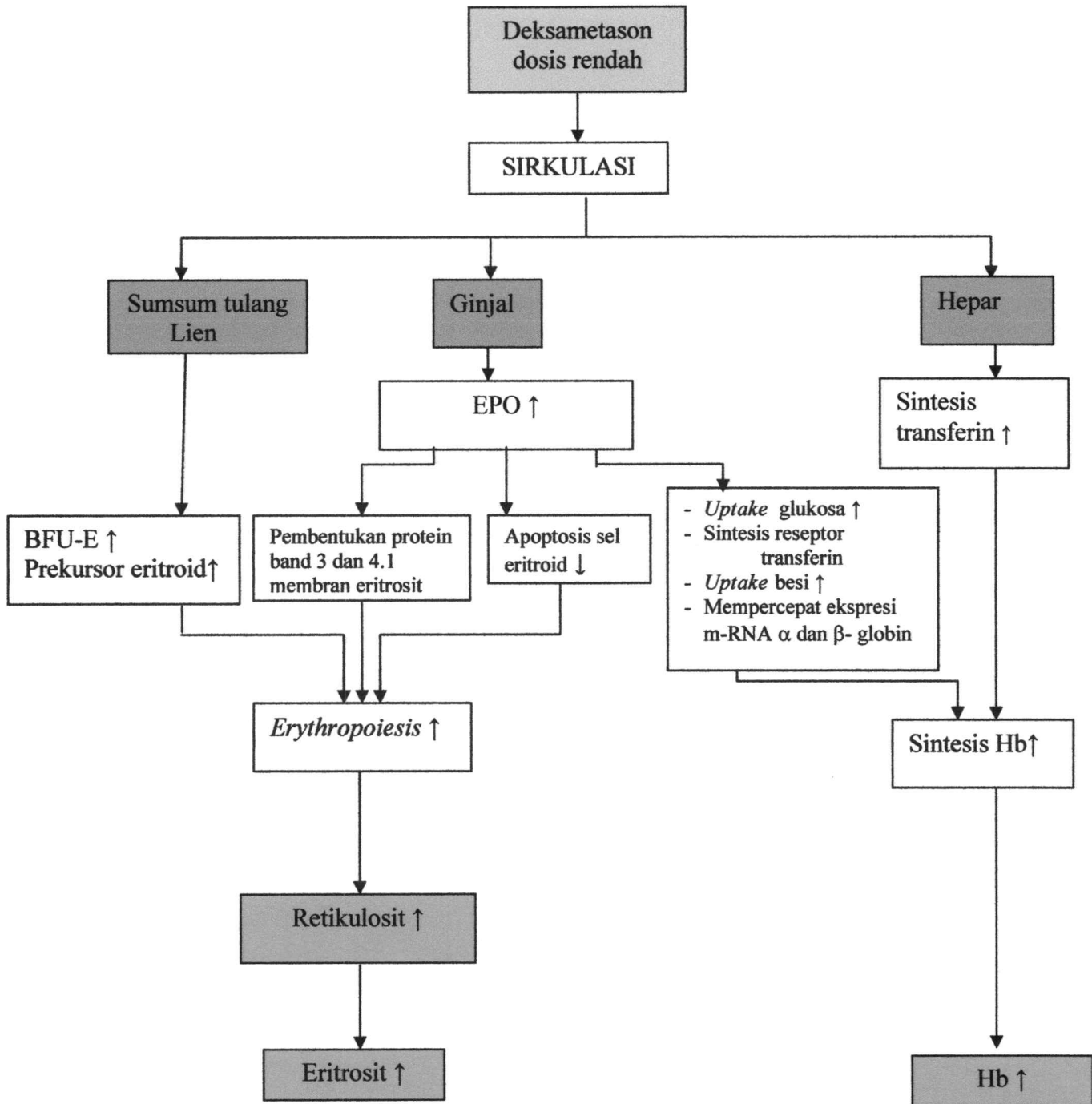
Sedangkan induksi anemia dengan obat *phenylhydrazine* selama 2 hari pada *wild type mice* dan *GR<sup>dim/dim</sup> mice* menyebabkan peningkatan glukokortikoid di sirkulasi (26-38 µg/dL) dibandingkan keadaan basal (3-7 µg/dL) baik pada *wild wild type mice* maupun *GR<sup>dim/dim</sup> mice* dibandingkan kontrol. Pada *anemic wild wild type mice* terjadi peningkatan jumlah eritrosit, kadar Hb, Hct dibandingkan *normoxic wild wild type mice*, namun pada *anemic GR<sup>dim/dim</sup> mice* tidak didapatkan peningkatan jumlah eritrosit, kadar Hb, dan Hct. Hasil ini juga dikonfirmasi dengan kenaikan CFU-E lien pada *anemic wild type mice* namun tidak pada *anemic GR<sup>dim/dim</sup> mice*. Kondisi ini menunjukkan bahwa adaptasi yang cepat terhadap stress hipoksia dengan peningkatan jumlah eritrosit, kadar Hb dan Hct pada darah tepi tidak dapat terjadi tanpa peran dari glukokortikoid dan reseptornya.

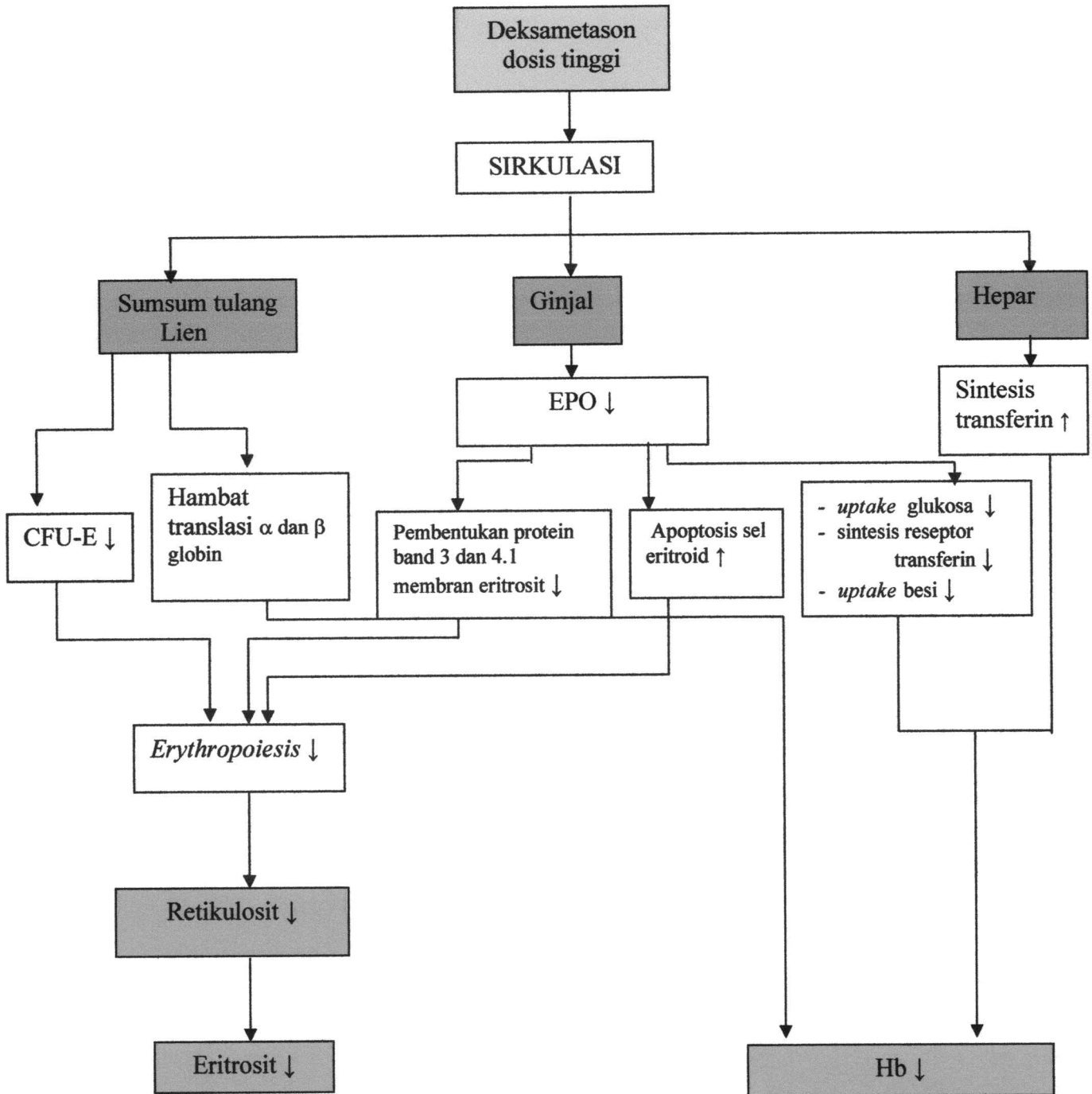


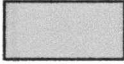
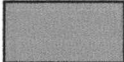
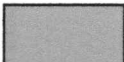
**BAB 3**

**KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN**

**3.1 Kerangka Konseptual Penelitian**





	Pemberian Perlakuan
	Organ yang mendapatkan rangsangan deksametason
	Hipotesis Penelitian

### 3.2 Penjelasan kerangka konseptual penelitian

Deksametason sebagai preparat sintetik glukokortikoid mempengaruhi *erythropoiesis* melalui ikatan dengan reseptor glukokortikoid yang berada di sumsum tulang dan lien, ginjal serta hepar.

Deksametason dosis rendah merangsang *erythropoiesis* dengan cara meningkatkan prekursor sel eritroid di sumsum tulang (Malgor, 1987) dan BFU-E (Steinberg, 1981). Selain itu, deksametason dosis rendah meningkatkan produksi EPO di ginjal (Malgor, 1987; Fisher 1998 cit Bauer, 1999). EPO berperan pada tahap akhir differensiasi yaitu berperan dalam proses peningkatan *uptake* glukosa, sintesis reseptor transferin, peningkatan *uptake* besi, berperan pada proses pembentukan protein membran eritrosit (band 3 dan protein 4.1) (Krantz, 1991; Beutler, 1995). EPO ini juga berperan melindungi sel eritroid dari apoptosis pada saat akhir maturasi eritrosit (Kolbus, 2003), dengan cara upregulasi protein antiapoptosis Bcl-X(L) (Dolznic, 2002). Penambahan EPO pada CFU-E in vitro menyebabkan ekspresi yang cepat dari m-RNA  $\alpha$  dan  $\beta$ - globin, segera setelah itu akan terjadi sintesis hemoglobin (Beutler, 1995). Sedangkan pengaruh glukokortikoid pada hepar yaitu meningkatkan sintesis protein, termasuk transferin (Guyton, 2006; Chou, 1983). Transferin berfungsi mengangkut besi yang dibutuhkan untuk sintesis heme pada proses sintesis

hemoglobin. Keseluruhan efek ini akan meningkatkan *erythropoiesis* yang digambarkan dengan meningkatnya jumlah retikulosit, eritrosit dan kadar Hb dalam darah.

Deksametason dosis tinggi menurunkan *erythropoiesis* dengan cara menghambat pembentukan koloni eritroid melalui penurunan proliferasi *fetal liver* CFU-E (Leung, 1985), dan menurunkan produksi EPO di ginjal (Fisher, 1977). Penurunan EPO menyebabkan penurunan pada *uptake* glukosa, sintesis reseptor transferin, *uptake* besi, dan proses pembentukan protein membran eritrosit (band 3 dan protein 4.1) (Krantz, 1991; Beutler, 1995). Selain itu peran EPO dalam melindungi sel eritroid dari apoptosis pada saat akhir maturasi eritrosit (Kolbus, 2003), juga berkurang. Sedangkan efeknya pada hepar meningkatkan sintesis transferin dengan meningkatkan m-RNA transferin (MC Knight, 1980). Namun peningkatan sintesis transferin yang tidak diikuti peningkatan sintesis reseptor transferin oleh karena EPO yang menurun, tidak akan meningkatkan sintesis Hb. Selain itu, deksametason dosis tinggi menghambat translasi dari  $\alpha$  dan  $\beta$ -globin (Papaconstantinou, 1983), sehingga menurunkan sintesis Hb. Keseluruhan efek ini akan menurunkan *erythropoiesis* yang digambarkan dengan menurunnya jumlah retikulosit, eritrosit dan kadar Hb dalam darah.

### **3.3 Hipotesis Penelitian**

1. Efek pemberian deksametason dosis rendah, dapat meningkatkan jumlah retikulosit, eritrosit dan kadar Hb dalam darah.
2. Efek pemberian deksametason dosis tinggi, dapat menurunkan jumlah retikulosit, eritrosit dan kadar Hb dalam darah.

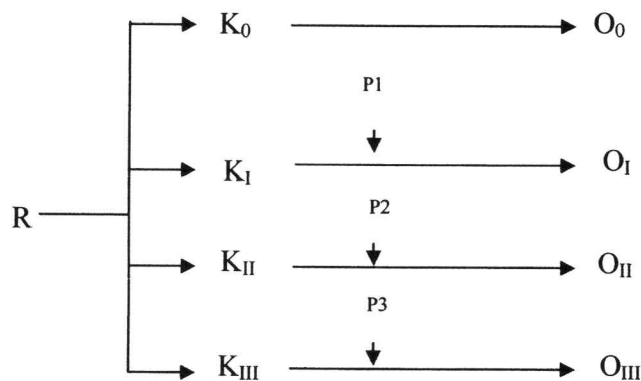
## BAB 4

## MATERI DAN METODE PENELITIAN

## 4.1. Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang akan dilakukan adalah penelitian eksperimental laboratoris. Rancangan penelitian yang digunakan adalah *The Randomized Separate Sample Pretest-Posttest Control Group Design* (Campbell, 1966).

Secara skematis, rancangan penelitian ini dapat digambarkan sebagai berikut:



Keterangan :

- R : randomisasi
- K<sub>0</sub> : Kelompok *separate pretest* (tanpa perlakuan)
- K<sub>I</sub> : Kelompok perlakuan 1.
- K<sub>II</sub> : Kelompok perlakuan 2.
- K<sub>III</sub> : Kelompok perlakuan 3 (kontrol *posttest*).

- P1 : Perlakuan 1 (pemberian injeksi intramuskular deksametason dosis rendah, 0,1 mg / 200 g BB, 1 kali/hari, selama 6 hari, data diambil 24 jam setelah injeksi terakhir).
- P2 : Perlakuan 2 (pemberian injeksi intramuskular deksametason dosis tinggi, 1 mg / 200 g BB, 1 kali/hari, selama 6 hari, data diambil 24 jam setelah injeksi terakhir).
- P3 : Perlakuan 3 (pemberian injeksi intramuskular *normal saline*, 1 kali/hari, selama 6 hari, data diambil 24 jam setelah injeksi terakhir).
- O<sub>0</sub> : Observasi 0 ( data *separate pretest* )
- O<sub>I</sub> : Observasi 1 (pengambilan data perlakuan 1).
- O<sub>II</sub> : Observasi 2 (pengambilan data perlakuan 2).
- O<sub>III</sub> : Observasi 3 (pengambilan data perlakuan 3).

## 4.2. Populasi, Sampel, Besar Sampel dan Teknik Pengambilan Sampel

### 4.2.1. Populasi dan Sampel

Populasi dan sampel dalam penelitian menggunakan *Rattus norvegicus* galur *Wistar* jenis kelamin jantan dengan berat badan 185-210 gram, berumur 3-3,5 bulan dengan kondisi sehat fisik.

### 4.2.2 Besar Sampel

Besar sampel ditentukan dengan rumus Pudjirahardjo (1993) :

$$n = \frac{1}{1-f} \times \frac{(Z_{\alpha} + Z_{\beta})^2 \cdot Q_d^2}{\delta^2}$$



Dari perhitungan diperoleh besar sampel sebanyak 7 ekor sampel tiap kelompok perlakuan (4 kelompok), sehingga besar sampel secara keseluruhan adalah 28 ekor sampel. Perhitungan besar sampel selengkapnya terdapat pada Lampiran 1.

#### **4.2.3. Teknik Pengambilan Sampel**

Pengambilan sampel dan pembagian kelompok dilakukan dengan cara *simple random sampling*. Sampel diambil dengan cara pemberian label nomor pada tikus kemudian dilakukan lotre untuk dimasukkan ke kelompok masing-masing sebanyak 7 ekor. Setelah didapatkan tikus untuk masing-masing kelompok, tikus kemudian diwarnai pada kepala (1), punggung (2), dada (3), kaki kanan (4), kaki kiri (5) ekor (6), dan kosong (7).

### **4.3. Variabel Penelitian**

#### **4.3.1. Variabel Bebas (*Independent*)**

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah pemberian deksametason dosis rendah dan tinggi.

#### **4.3.2. Variabel Tergantung (*dependent*)**

Variabel tergantung meliputi :

1. Jumlah retikulosit
2. Jumlah eritrosit
3. Kadar Hb

#### **4.3.3. Variabel moderator**

1. Berat Badan
2. Volume Plasma



#### 4.3.4. Variabel Kendali

Variabel kendali meliputi :

1. Galur hewan coba
2. Jenis kelamin hewan coba.
3. Umur hewan coba.
4. Keadaan hipoksia.
5. Kesehatan fisik hewan coba
6. Faktor lingkungan laboratorium untuk pemeriksaan.

### 4.4 Definisi Operasional Variabel

#### 4.4.1 Pemberian deksametason

Pemberian deksametason adalah pemberian injeksi intramuskular pada otot *quadriceps femoris*. Injeksi intramuskular deksametason dosis rendah dilakukan 1 kali/hari, selama 6 hari pada K<sub>I</sub> dan injeksi intramuskular deksametason dosis tinggi dilakukan 1 kali/hari, selama 6 hari, pada K<sub>II</sub>.

Dosis pemberian deksametason dosis rendah adalah 0,1 mg / 200 g BB tikus. Sedangkan dosis tinggi 1 mg / 200 g BB tikus. Volume deksametason sebanyak 0,1 ml. Perhitungan pemberian deksametason selengkapnya dapat dilihat pada Lampiran 2.

#### 4.4.2 Pemberian plasebo

Yang dimaksud dengan pemberian plasebo adalah pemberian injeksi intramuskular *normal saline*. Injeksi intramuskular dilakukan 1 kali/hari, selama 6 hari pada K<sub>III</sub>.

Volume injeksi intramuskular yang diberikan sama dengan volume injeksi intramuskular deksametason yaitu sebanyak 0,1 ml.

#### 4.4.3 Retikulosit

Retikulosit adalah sel eritrosit muda yang masih dijumpai sisa-sisa inti RNA (benang retikulom) yang berwarna biru dengan pewarnaan *metilen blue* dalam sediaan hapus darah tepi. Dinyatakan dalam % (Price, 2006).

#### 4.4.4 Jumlah Eritrosit

Jumlah eritrosit adalah banyaknya eritrosit yang terdapat dalam satu  $\mu\text{l}$  darah. Penghitungan dengan menggunakan larutan Hayem, satuan dalam juta sel ( $10^6 / \mu\text{l}$ ) (Lee, 1999).

#### 4.4.5 Kadar hemoglobin

Kadar hemoglobin adalah berat konversi hemoglobin yang telah menjadi sianmethemoglobin yang terdapat pada tiap 100 ml (satu dl) darah, dengan menggunakan metode Sahli. Dinyatakan dalam satuan g/dl (Lee, 1999)

#### 4.4.6 Jenis hewan coba

Jenis hewan coba adalah *Rattus norvegicus* galur *Wistar* dari UPHP ( Unit Penangkaran Hewan Penelitian ) Universitas Gajah Mada Yogyakarta.

#### 4.4.7 Jenis kelamin hewan coba

Jenis kelamin hewan coba adalah jantan.

#### 4.4.8 Umur hewan coba

Hewan coba berusia dewasa yaitu antara 3 sampai 3,5 bulan.

#### 4.4.9 Berat badan hewan coba

Berat badan hewan coba 185-210 gram.

#### 4.4.10 Kesehatan fisik hewan coba

Kesehatan fisik hewan coba, berbadan sehat dengan ciri-ciri (Farris, 1962):

1. Bermata jernih.
2. Bulu mengkilat.

3. Gerakan aktif / lincah.
4. *Feces* baik / tidak lembek.
5. Berat badan tidak turun lebih dari 10% selama proses aklimatisasi.

#### 4.4.11 Pemeliharaan dan perawatan hewan coba

Pemeliharaan dan perawatan hewan coba dilakukan di sebuah kandang dengan ukuran 30 x 40 cm dimana masing-masing kandang berisi 4 ekor hewan coba. Kandang dibuat dari bak plastik yang ditutup dengan anyaman kawat serta beralas sekam. Setiap hari sekam diganti untuk menjaga kebersihan kandang. Pakan yang digunakan adalah pakan hewan jenis CP 524-2 dari PT.Charoen Pokphand dan diberi minum air PDAM.

### 4.5 Bahan Penelitian dan Alat Penelitian

#### 4.5.1 Bahan Penelitian

##### 1. Hewan Coba

Menggunakan *Rattus norvegicus* galur *Wistar* dari UPHP ( Unit Penangkaran Hewan Penelitian ) Universitas Gajah Mada Yogyakarta.

##### 2. Bahan untuk Perlakuan

Bahan untuk perlakuan adalah :

- a. Deksametason dalam bentuk larutan untuk injeksi, berupa larutan deksametason natrium fosfat. Sediaan deksametason dalam bentuk ampul 1 ml dengan konsentrasi 20 mg/ml. Deksametason yang digunakan adalah produksi Organon.
- b. Larutan *normal saline* dalam bentuk larutan 500 ml setiap flabot.  
Larutan *normal saline* yang digunakan adalah produksi Otsuka.

### 3. Bahan untuk Pemeriksaan

Bahan untuk pemeriksaan adalah :

- a. Larutan EDTA
- b. Larutan Hayem
- c. Larutan HCL 0,1 N
- d. Larutan *Brilliantcresylblue* (BCB) satu %, produksi Merck

#### 4.5.2 Alat Penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah :

1. Kandang berukuran 30 x 40 cm.
2. Tempat pakan.
3. Tempat minum untuk tikus.
4. Timbangan torbal (*Thorsion Balance*) untuk berat badan tikus.
5. Lempengan logam.
6. Alat pembedahan tikus berupa pisau, gunting dan pinset.
7. Advia 120 produksi Bayer.
8. Mikroskop cahaya binokuler.
9. Obyek glas.
10. Kaca penutup (*cover glass*).
11. Mikro pipet 50  $\mu$ l.
12. Tabung reaksi 5 ml.
13. Sput 3 ml
14. Sput 1 ml.
15. Gelas ukur.
16. Tissue.

17. Kertas label.

#### **4.6 Tempat dan Waktu Penelitian**

##### **4.6.1 Tempat penelitian**

Penelitian dilakukan di Laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga Surabaya

##### **4.6.2 Waktu penelitian**

Penelitian ini dilakukan dalam waktu 1 bulan, pada bulan juni 2006

##### **4.6.3 Tempat Pemeriksaan Laboratorium**

Pemeriksaan laboratorium dilakukan di Laboratorium Prodia, Jl. Diponegoro, Surabaya.

#### **4.7 Prosedur Penelitian**

##### **4.7.1 Aklimatisasi**

Aklimatisasi hewan coba selama 7 hari terhadap air, makanan serta hawa di dalam kondisi laboratorium.

##### **4.7.2 Pembagian kelompok hewan coba**

Pembagian kelompok hewan coba dilakukan secara random dan terdiri dari 4 kelompok yaitu :

1. Ko = Kelompok *separate pretest* ( tanpa perlakuan)
2. K<sub>1</sub>= Kelompok perlakuan 1 (pemberian injeksi intramuskular deksametason dosis 0,1 mg / 200 g BB, 1 kali/hari, selama 6 hari, data diambil 24 jam setelah injeksi terakhir).

3.  $K_{II}$  = Kelompok perlakuan 2 (pemberian injeksi intramuskular deksametason dosis 1 mg / 200 g BB, 1 kali/hari, selama 6 hari, data diambil 24 jam setelah injeksi terakhir).
4.  $K_{III}$  = Kelompok perlakuan 3 (pemberian injeksi intramuskular *normal saline*, 1 kali/hari, selama 6 hari, data diambil 24 jam setelah injeksi terakhir ).

#### 4.7.3 Penimbangan berat badan

Penimbangan berat badan dilakukan satu kali sebelum perlakuan pada semua kelompok. Hewan coba ditimbang dengan menggunakan timbangan Torbal dalam satuan gram dengan ketelitian satu angka dibelakang koma. Penimbangan ditujukan untuk homogenitas berat badan tikus.

#### 4.7.4 Pengambilan data pra perlakuan

Pengambilan data *separate pretest* dilakukan pada kelompok 0 (K0) dilakukan sebelum pelaksanaan perlakuan.

#### 4.7.5 Pelaksanaan perlakuan

Injeksi intramuskular deksametason dosis rendah diberikan 1 kali/hari selama 6 hari untuk kelompok  $K_I$  dan dosis tinggi 1 kali/hari selama 6 hari untuk kelompok  $K_{II}$  . Dosis pemberian injeksi intramuskular deksametason adalah untuk dosis rendah 0,1 mg / 0,1 ml / 200 g BB tikus / kali injeksi, dosis tinggi 1 mg / 0,1 ml / 200 g BB tikus/ kali injeksi.

Sedangkan pemberian injeksi intramuskular *normal saline* dilakukan 1 kali/hari selama 6 hari pada kelompok  $K_{III}$ . Adapun volume *normal saline* yang diinjeksikan secara intramuskular adalah sebanyak 0,1 ml / kali injeksi.

#### 4.7.6 Pembiusan

Pembiusan dilakukan dengan menggunakan *ether*. Tikus dimasukkan ke dalam toples kaca dan ditutup dengan kaca, kemudian larutan *ether* diteteskan ke dalam toples tersebut. Tikus diangkat dari toples jika sudah tidak bergerak lagi (kira-kira  $\frac{1}{2}$  - 1 menit setelah *ether* diteteskan).

#### 4.7.7 Prosedur pengambilan darah

Darah tikus diambil setelah dilakukan pembiusan yang dilakukan dengan pengambilan langsung dari jantung sebanyak kurang lebih 2 ml.

Berikut adalah cara pengambilan darah pada tikus (Farris, 1962) :

1. Tikus yang telah dibius diletakkan pada lempeng logam untuk dilakukan pembedahan.
2. Pembedahan dilakukan dengan alat-alat bedah yang dimulai dengan membuka kulit sampai otot dengan gunting mulai daerah epigastrium sampai nampak jantung tikus.
3. Darah diambil sebanyak-banyaknya dari ventrikel dengan menggunakan spuit 3 ml untuk dilakukan pemeriksaan.
4. Darah yang telah diambil dimasukkan ke dalam tabung yang telah berisi larutan EDTA, kemudian tabung digoyang-goyangkan supaya darah tercampur homogen dengan larutan EDTA.
5. Tikus selanjutnya dikorbankan.

#### 4.8 Analisis data

Data hasil penelitian dianalisis dengan menggunakan program SPSS for *Windows XP* yang meliputi analisis statistik sebagai berikut :

1. **Uji statistik deskriptif** untuk mengetahui karakteristik data hasil pengukuran variabel pada semua kelompok perlakuan.
2. **Uji normalitas distribusi** untuk mengetahui apakah distribusi data yang diperoleh tidak berbeda dengan distribusi data normal. Uji normalitas dilakukan dengan metode non parametrik (*Uji Kolmogorov-Smirnov*). Pengujian ini perlu dilakukan untuk memenuhi prasyarat uji parametrik.
3. **Uji homogenitas data awal** untuk mengetahui adanya homogenitas data awal antar kelompok. Pengujian ini perlu dilakukan untuk memenuhi prasyarat uji Manova.
4. **Uji Manova** untuk membandingkan respon perubahan beberapa variabel tergantung antara kelompok perlakuan dan kontrol dalam periode waktu pengamatan yang sama.



## BAB 5

## ANALISIS HASIL PENELITIAN

## 5.1. Data Penelitian

Data yang didapat dari hasil penelitian berupa jumlah retikulosit, eritrosit dan kadar Hb, selengkapnya dapat dilihat di Lampiran 4 Halaman 79.

## 5.2 Analisis dan Hasil Penelitian

## 5.2.1 Hasil analisis deskriptif

Hasil analisis deskriptif variabel tergantung dapat dilihat pada tabel 5.1 dibawah ini:

Tabel 5.1 Nilai rerata dan SD variabel tergantung pada tiap kelompok

Kelompok		Variabel		
		Retikulosit (%)	Eritrosit ( $10^6/\mu\text{L}$ )	Hb (g/dL)
K <sub>0</sub> (tanpa perlakuan, data <i>separate pretest</i> )	Rerata	1,7143	8,1686	15,0429
	SD	1,0319	0,4008	0,8364
K <sub>I</sub> (Injeksi deksametason dosis rendah)	Rerata	3,0714	8,7129	15,4286
	SD	0,6317	0,3398	0,7319
K <sub>II</sub> (injeksi deksametason dosis tinggi)	Rerata	1,7429	8,6357	15,1429
	SD	0,4036	0,4660	1,3352
K <sub>III</sub> (injeksi <i>normal saline</i> )	Rerata	2,7857	8,2500	13,8571
	SD	1,0961	0,5426	0,9589

Keterangan :

- g = gram
- $\mu\text{L}$  = mikroliter
- dL = desiliter ( $10^{-1}$  liter)

Data analisis deskriptif selengkapnya terdapat dalam Lampiran 5 Halaman 80-82. Analisis selanjutnya adalah uji normalitas distribusi sebagai prasyarat uji parametrik dan uji homogenitas data awal sebagai prasyarat uji Manova.

### 5.2.2 Hasil Uji Normalitas Distribusi

Hasil uji normalitas dengan *Kolmogorov-Smirnov test* menunjukkan data seluruh kelompok berdistribusi normal ( $p > 0,05$ ). Hasil uji normalitas distribusi selengkapnya pada Lampiran 6 Halaman 83-84.

### 5.2.3 Hasil Uji Homogenitas

Untuk meyakinkan bahwa faktor-faktor yang dijadikan variabel moderator tidak akan mempengaruhi analisis hasil, maka secara statistik harus diuji melalui uji homogenitas dengan Anova. Variabel moderator yang diuji homogenitasnya meliputi berat badan dan volume plasma dari masing-masing kelompok. Untuk mengontrol pengaruh volume plasma, maka perlu dilakukan uji homogenitas hematokrit pada seluruh kelompok. Rata-rata dan simpangan baku variabel moderator pada masing-masing kelompok dapat dilihat pada tabel 5.2 dibawah ini:

Tabel 5.2 Nilai rerata dan SD variabel moderator pada tiap kelompok

Kelompok		Variabel	
		Berat Badan (gram)	Hematokrit (%)
K <sub>0</sub> (tanpa perlakuan, data <i>separate pretest</i> )	Rerata	194,1429	41,9857
	SD	9,17294	2,74374
K <sub>I</sub> (Injeksi deksametason dosis rendah)	Rerata	193,2857	43,3714
	SD	6,47339	1,33880
K <sub>II</sub> (injeksi deksametason dosis tinggi)	Rerata	196,2857	41,9857
	SD	9,58670	2,06271
K <sub>III</sub> (injeksi <i>normal saline</i> )	Rerata	192,8571	41,1143
	SD	9,73702	2,69594
p		0,890	0,342

Hasil uji Anova ( Lampiran 7 dan 8, Halaman 85-86 ) menunjukkan variabel berat badan yang homogen ( $p > 0,05$ ), demikian juga variabel hematokrit ( $p > 0,05$ ).

#### 5.2.4 Hasil analisis $K_{III} - K_0$

Untuk mengontrol proses maturasi, diperlukan analisis data  $K_{III} - K_0$ . Hasil uji manova  $K_{III} - K_0$  dengan metode *Hotelling's trace* menunjukkan ada perbedaan signifikan ( $p = 0,001$ ) selengkapnya pada Lampiran 9 Halaman 87. Karena adanya perbedaan yang signifikan antara  $K_0$  dan  $K_{III}$ , maka dilakukan akurasi data  $K_I$  dan  $K_{II}$  dengan menggunakan delta  $K_{III} - K_0$ . Sehingga data baru yang diperoleh merupakan akibat injeksi deksametason dosis rendah dan tinggi tanpa ada pengaruh maturasi. Kemudian data dianalisis sesuai dengan tujuan penelitian, yaitu membandingkan  $K_I$  dengan  $K_0$  dan  $K_{II}$  dengan  $K_0$ .

#### 5.2.5 Hasil analisis deskriptif data koreksi

Hasil analisis deskriptif variabel tergantung dapat dilihat pada tabel 5.3 dibawah ini:

Tabel 5.3 Nilai rerata dan SD variabel tergantung data koreksi pada tiap kelompok

Kelompok		Variabel		
		Retikulosit (%)	Eritrosit ( $10^6/\mu\text{L}$ )	Hb (g/dL)
$K_0$ (tanpa perlakuan, data pretest)	Rerata	1,7143	8,1686	15,0429
	SD	1,0319	0,4008	0,8364
$K_I$ (Injeksi deksametason dosis rendah)	Rerata	2,0000	8,6315	16,6144
	SD	0,6317	0,3398	0,7319
$K_{II}$ (injeksi deksametason dosis tinggi)	Rerata	0,6715	8,5543	16,3287
	SD	0,4036	0,4660	1,3352

Data analisis deskriptif data koreksi selengkapnya terdapat dalam Lampiran 11 Halaman 89-91. Analisis selanjutnya adalah uji normalitas distribusi

sebagai prasyarat uji parametrik dan uji homogenitas data awal sebagai prasyarat uji Manova.

### 5.2.6 Hasil Uji Normalitas Distribusi data koreksi

Hasil uji normalitas dengan *Kolmogorov-Smirnov test* menunjukkan data koreksi seluruh kelompok berdistribusi normal ( $p > 0,05$ ). Hasil uji normalitas distribusi selengkapnya pada Lampiran 12 Halaman 92-93.

### 5.2.7 Hasil analisis $K_I - K_0$

Hasil uji manova  $K_I - K_0$  dengan metode *Hotelling's trace* menunjukkan ada perbedaan signifikan ( $p = 0,025$ ) selengkapnya pada Lampiran 13 Halaman 94-96, sedangkan hasil uji Univariat menunjukkan ada perbedaan yang signifikan pada variabel Hb ( $p < 0,05$ ) dan eritrosit ( $p < 0,05$ ), selengkapnya pada tabel 5.4 dibawah ini:

Tabel 5.4 Uji Univariat  $K_I - K_0$

VARIABEL	$K_I$	$K_0$	F	p
Retikulosit	2,0000	1,7143	0,390	0,544
Eritrosit	8,6315	8,1686	5,431	0,038
Hemoglobin	16,6144	15,0429	13,995	0,003

### 5.2.8 Hasil analisis $K_{II} - K_0$

Hasil uji manova  $K_{II} - K_0$  dengan metode *Hotelling's trace* menunjukkan tidak ada perbedaan signifikan ( $p = 0,153$ ) selengkapnya pada Lampiran 14 Halaman 97-99, namun hasil uji Univariat menunjukkan ada perbedaan yang signifikan pada variabel retikulosit ( $p < 0,05$ ), selengkapnya pada tabel 5.5 dibawah ini:

Tabel 5.5 Uji Univariat  $K_{II} - K_0$ 

VARIABEL	$K_{II}$	$K_0$	F	p
Retikulosit	0,6715	1,7143	6,201	0,028
Eritrosit	8,5543	8,1686	2,757	0,123
Hemoglobin	16,3287	15,0429	4,662	0,052

## BAB 6

### PEMBAHASAN

Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan efek pemberian deksametason terhadap jumlah retikulosit, eritrosit dan kadar Hb pada tikus putih ( *Rattus norvegicus* galur *Wistar* jantan ). Rancangan penelitian menggunakan *The Randomized Separate Sample Pretest-Posttest Control Group Design* (Campbell, 1966). *Data separate pretest* digunakan untuk mendapatkan data awal variabel tergantung tanpa memberikan perlakuan untuk dibandingkan dengan data *posttest*. Pengambilan unit analisis darah untuk pemeriksaan laboratorium dengan metode Advia 120 membutuhkan 2 ml darah sehingga sampel penelitian harus dikorbankan.

Pengambilan sampel tikus pada usia dewasa 3 – 3½ bulan, karena kadar Hb dan jumlah retikulosit pada tikus putih stabil pada usia dewasa . Pada tikus putih kadar Hb meningkat secara *irregular* sampai mencapai dewasa. Demikian pula jumlah retikulosit, setelah lahir terjadi retikulositosis sampai 95%, kemudian selama 1 minggu turun dengan cepat, berikutnya meningkat lagi perlahan, dan akhirnya menurun perlahan dan *irregular* sampai tercapai tingkat dewasa pada akhir bulan ketiga (Farris, 1962). Jenis kelamin jantan dipilih untuk menghindari adanya menstruasi pada betina yang akan mempengaruhi variabel tergantung. Selain itu jenis kelamin jantan dipilih untuk homogenitas sampel, karena hormon testosteron dapat mempengaruhi *erythropoiesis*. Berat badan tikus antara 180-210 gram karena rata-rata berat badan tikus dewasa antara 175-250 gram. Kondisi tikus sehat ditujukan untuk mendapatkan *erythropoiesis* yang normal.

Obat yang digunakan adalah deksametason karena merupakan preparat sintesis glukokortikoid yang mudah didapatkan di pasaran. Selain itu deksametason merupakan glukokortikoid yang tidak memiliki efek mineralokortikoid sehingga sesuai dengan penelitian ini yang ingin mengetahui pengaruh hormon stress ( glukokortikoid ) terhadap produksi eritrosit. Sedangkan alasan tidak digunakan kortikosteron yang merupakan glukokortikoid utama pada tikus adalah kortikosteron merupakan suatu mineralokortikoid dengan efek pada keseimbangan air dan elektrolit yang besar ( Goldfien, 2001 ).

Injeksi deksametason dilakukan selama 6 hari karena proses *erythropoiesis* yang normal terjadi dalam waktu 5-10 hari. Digunakan injeksi intramuskular karena terapi yang sering digunakan adalah injeksi secara intramuskular. Untuk mengontrol pengaruh proses maturasi maka ada kelompok kontrol *posttest* yang juga di injeksi secara intramuskular dengan *normal saline* produksi Otsuka. Volume injeksi yang sama dengan volume injeksi intramuskular deksametason. *Normal saline* merupakan larutan fisiologis yang dianggap paling aman karena komposisinya sama dengan cairan tubuh. Pengambilan data *posttest* dilakukan 24 jam setelah injeksi terakhir sesuai dengan penelitian untuk melihat produksi eritrosit pemeriksaan unit analisis dilakukan 24 jam setelah stressor terakhir diberikan ( Bauer, 1999).

Pengukuran jumlah retikulosit untuk melihat pengaruh deksametason terhadap reseptor glukokortikoid di sumsum tulang dan lien tikus yang mempengaruhi *erythropoiesis*, karena jumlah retikulosit pada darah dapat menunjukkan *erythropoiesis* (Lee, 1999). Jumlah eritrosit dan kadar Hb

memberikan gambaran eritrosit pada sirkulasi perifer, dapat memberi informasi tentang *erythropoiesis*, destruksi eritrosit dan gambaran sintesis Hb.

Untuk mendapatkan gambaran perubahan masing-masing variabel tergantung dilakukan analisis deskriptif pada seluruh kelompok. Uji normalitas data dilakukan untuk melihat gambaran normalitas distribusi data variabel tergantung pada seluruh kelompok perlakuan karena uji normalitas dilakukan sebagai syarat untuk analisis selanjutnya. Hasil uji normalitas variabel tergantung untuk seluruh kelompok perlakuan menunjukkan gambaran berdistribusi normal ( $p > 0,05$ , Lampiran 6 Halaman 83).

Prinsip pengukuran variabel di dalam darah diperlukan adanya gambaran volume darah yang konstan, sebab parameter kadar bahan atau zat dalam darah sangat ditentukan oleh perubahan volume plasma, apalagi, jika bahan atau zat tersebut berjumlah sangat rendah (Setyawan, 1996). Untuk mengontrol pengaruh volume plasma, maka perlu dilakukan uji homogenitas hematokrit (secara tidak langsung menggambarkan volume plasma) pada semua kelompok. Hasil uji Anova menunjukkan tidak adanya perbedaan yang bermakna ( $p > 0,05$ ). Dengan demikian kadar hematokrit tidak akan mempengaruhi hasil pengukuran dalam penelitian ini.

Untuk mengetahui pengaruh maturasi sistem tubuh pada sampel penelitian, maka dilakukan uji manova antara *separate pretest* (K0) dengan kontrol *posttest* (KIII). Hasil uji manova dengan metode *Hotelling's trace* menunjukkan ada perbedaan yang signifikan ( $p = 0,001$ ). Oleh karena adanya perbedaan antara kelompok kontrol *separate pretest* dan *posttest* disebabkan proses maturasi, maka data variabel tergantung dari kelompok perlakuan injeksi



deksametason dosis rendah (KI) dan tinggi (KII) harus dikoreksi maturasinya dengan cara mengurangi data KI dan KII dengan delta KIII-K0. Untuk selanjutnya seluruh uji data digunakan data variabel yang telah terkoreksi ( Lampiran 10 Halaman 88 ).

Untuk mendapatkan gambaran perubahan masing-masing variabel tergantung dilakukan analisis deskriptif pada seluruh kelompok penelitian. Untuk menjawab tujuan penelitian dilakukan analisis data KI- K0 dan KII- K0.

Uji Manova pada data dosis rendah dan *separate pretest* ( KI-K0 ) menunjukkan ada perbedaan yang signifikan antara KI dan K0 ( $p = 0,025$ ). Uji univariat menunjukkan tidak ada perbedaan yang signifikan pada variabel retikulosit ( $p = 0,544$  ), tetapi terdapat perbedaan yang signifikan pada variabel eritrosit ( $p = 0,038$  ) dan Hb ( $p = 0,003$  ).

Injeksi deksametason dosis rendah ( 0,1 mg / 200 gBB ) selama 10 hari merangsang *erythropoiesis* pada tikus anemia karena nefrektomi dengan cara meningkatkan produksi EPO pada masa ginjal yang tersisa. Selain itu, efek permisif deksametason meningkatkan sensitifitas sel yang responsif EPO pada sumsum tulang. Peningkatan *erythropoiesis* dibuktikan dengan peningkatan jumlah absolut prekursor sel eritroid per miligram sumsum tulang. Sedangkan pada sirkulasi didapatkan peningkatan jumlah retikulosit, peningkatan kadar Hb dan hematokrit (Malgor, 1987). Pada penelitian secara *in vitro*, deksametason dosis rendah meningkatkan jumlah BFU-E dari pasien *sickle cell anemia*. Masing-masing BFU-E tampak lebih besar dan mengandung lebih banyak subkoloni (Steinberg, 1981).

Hasil dari penelitian ini ternyata pemberian deksametason dosis rendah selama 6 hari telah meningkatkan kadar Hb dan jumlah eritrosit secara signifikan dan meningkatkan jumlah retikulosit meskipun tidak signifikan.

Peningkatan jumlah retikulosit dan eritrosit di sirkulasi dapat dijelaskan oleh karena pemberian deksametason dosis rendah menyebabkan peningkatan EPO (Malgor, 1987). EPO berperan saat *erythropoiesis* pada tahap akhir differensiasi yaitu pembentukan protein membran eritrosit (band 3 dan protein 4.1) (Beutler, 1995). Protein membran ini berfungsi membentuk sitoskeleton, berperan menjaga stabilitas dan elastisitas membran eritrosit (Bennet, 2001). Selain itu pada domain sitoplasmik band 3 terikat secara reversibel haemoglobin dan enzim-enzim glikolisis seperti gliseraldehid 3-fosfat dehidrogenase, aldose, fosfofruktokinase. Jika terjadi kelainan pada enzim ini akan mengakibatkan perubahan bentuk eritrosit (Bennett, 2001). Jadi kedua protein membran ini mencegah eritrosit lisis, karena kelainan struktur eritrosit dapat menyebabkan eritrosit mudah lisis (Ganong, 2005; Guyton, 2006). Peningkatan EPO menyebabkan peningkatan *uptake* glukosa. Glukosa diperlukan untuk pembentukan ATP. ATP ini menyediakan energi yang digunakan untuk memelihara volume, bentuk dan kelenturan eritrosit (Voet, 1995), sehingga eritrosit tidak mudah lisis.

EPO ini juga berperan melindungi sel eritroid dari apoptosis pada saat akhir maturasi eritrosit (Kolbus, 2003), dengan cara upregulasi protein antiapoptosis Bcl-X(L) (Dolznic, 2002). Tanpa EPO, apoptosis progenitor eritroid berlangsung cepat dan sel mati, sedangkan jika ada EPO proses ini dihambat dan CFU-E *survive* sampai menjadi eritrosit (Krantz, 1991).

Peningkatan hemoglobin di sirkulasi terjadi karena modulasi deksametason sebagai preparat sintetik glukokortikoid pada hepar adalah meningkatkan sintesis protein, termasuk transferin (Guyton, 2006; Chou, 1983). Transferin berfungsi mengangkut besi yang dibutuhkan untuk sintesis heme pada proses sintesis Hb. Bersamaan dengan hal ini, peningkatan EPO yang terjadi berperan meningkatkan sintesis reseptor transferin dan peningkatan *uptake* besi. Peningkatan EPO juga menyebabkan peningkatan *uptake* glukosa yang diperlukan untuk sintesis Hb. Selain itu, penambahan EPO pada CFU-E *in vitro* menyebabkan ekspresi yang cepat dari m-RNA  $\alpha$  dan  $\beta$ - globin, segera setelah itu akan terjadi sintesis Hb (Beutler, 1995). Keseluruhan efek ini menyebabkan peningkatan sintesis Hb sehingga kadar Hb meningkat.

Uji Manova pada data dosis tinggi dan *separate pretest* (KII-K0) menunjukkan tidak ada perbedaan yang signifikan antara KII dan K0 ( $p = 0,153$ ). Namun pada uji univariat meskipun tidak ada perbedaan yang signifikan pada variabel eritrosit ( $p = 0,123$ ) dan Hb ( $p = 0,052$ ), tetapi terdapat perbedaan yang signifikan pada variabel retikulosit ( $p = 0,028$ ).

Dugaan semula pemberian deksametason dosis tinggi menurunkan jumlah retikulosit, eritrosit dan kadar Hb. Namun faktanya jumlah retikulosit signifikan menurun sedangkan jumlah eritrosit dan kadar Hb masih meningkat meskipun tidak signifikan.

Penelitian pada *mice*, glukokortikoid sirkulasi yang tinggi (26-38  $\mu\text{g/dL}$ ) dibandingkan keadaan basal (3-7  $\mu\text{g/dL}$ ) oleh karena induksi anemi dengan obat *phenylhydrazine* selama 2 hari menyebabkan peningkatan jumlah eritrosit dan kadar Hb di sirkulasi pada hari ke 3. Hal ini diperkuat dengan penanaman

suspensi sel lien *mice* yang sama pada medium semisolid terjadi peningkatan yang tajam CFU-E (Bauer, 1999).

Masih pada penelitian yang sama, glukokortikoid sirkulasi yang tinggi (22-35  $\mu\text{g/dL}$ ) dibandingkan keadaan basal (3-7  $\mu\text{g/dL}$ ) oleh karena induksi hipoksia selama 2 hari menyebabkan peningkatan jumlah eritrosit dan kadar Hb di sirkulasi pada hari ke 3. Hal ini diperkuat dengan penanaman suspensi sel lien *mice* yang sama pada medium semisolid terjadi peningkatan yang tajam CFU-E (Bauer, 1999). Dari penelitian Bauer (1999) ini, diperoleh informasi bahwa pemaparan glukokortikoid dosis tinggi selama 2 hari, pada hari ketiga diduga menyebabkan mobilisasi CFU-E dari sumsum tulang ke lien dan menyebabkan peningkatan jumlah eritrosit dan kadar Hb di sirkulasi.

Sedangkan kultur dari *fetal liver* selama 2 hari yang diperoleh dari *pregnant mice* yang diberi deksametason fosfat dosis tinggi 24 jam sebelumnya menunjukkan penghambatan pembentukan koloni eritroid melalui penurunan proliferasi *fetal liver* CFU-E (Leung, 1985). Dari penelitian tersebut, ternyata deksametason dosis tinggi menyebabkan penurunan proliferasi *fetal liver* CFU-E pada hari ketiga, meskipun pada penelitian tersebut tidak diukur jumlah retikulosit, eritrosit dan kadar Hb di sirkulasi.

Pada penelitian ini, pemberian deksametason dosis tinggi dalam waktu yang lama (6 hari) terbukti menurunkan produksi eritrosit ditandai dengan penurunan jumlah retikulosit pada hari ke 7. Pada *mice* yang mengalami hipoksia berat pada hari ke 6 dijumpai penurunan kadar EPO 48% dari kontrol (Fisher, 1977). Kondisi hipoksia menyebabkan peningkatan kadar glukokortikoid di sirkulasi yang sangat tinggi (Bauer, 1999). Penurunan produksi EPO dapat

menurunkan *erythropoiesis* pada sumsum tulang, sehingga jumlah retikulosit yang keluar dari sumsum tulang menurun (Szygula, 1990).

Jumlah eritrosit dan kadar Hb (hari ke 7) yang masih meningkat meskipun tidak signifikan karena respon awal pemberian deksametason dosis tinggi menyebabkan peningkatan mobilisasi stok produksi eritrosit yang sudah ada (CFU-E) (Bauer, 1999), bukan pada peningkatan produksi (Leung, 1985). Namun lama kelamaan jumlah eritrosit dan kadar Hb menurun karena produksi eritrosit yang menurun, dibuktikan dengan penurunan jumlah retikulosit yang signifikan pada hari ke 7. Hal ini didukung oleh fakta stress kronis dan olahraga berat dapat menurunkan jumlah eritrosit dan Hb (Szygula, 1990). Selain itu, penelitian yang dilakukan pada bayi *intrauteri* yang mengalami stress akibat kontraksi rahim terus-menerus ditemukan kejadian adanya *fetal anemia* (Broberg, 2003).

Dari hasil penelitian ini, maka pemberian dosis tinggi dalam waktu yang lama seperti pada penderita alergi dimungkinkan timbul kerugian penurunan jumlah eritrosit dan kadar Hb. Untuk membuktikannya perlu dilakukan pemberian deksametason dosis tinggi secara *time series* dengan gradasi dosis sehingga dapat diketahui perubahan respon yang terjadi dalam setiap waktu pengamatan yang dilakukan dengan dosis yang lebih bervariasi.

## BAB 7

### PENUTUP

#### 7.1 Kesimpulan

Dari hasil penelitian pemberian deksametason dosis rendah dan tinggi dapat disimpulkan bahwa:

1. Pemberian deksametason dosis rendah meningkatkan jumlah eritrosit dan kadar Hb, sedangkan jumlah retikulosit meningkat namun tidak signifikan.
2. Pemberian deksametason dosis tinggi menurunkan produksi eritrosit ( jumlah retikulosit ), sedangkan jumlah eritrosit dan kadar Hb masih meningkat meskipun tidak signifikan.

#### 7.2 Saran

1. Perlu kajian lebih lanjut secara *time series* menggunakan gradasi dosis, karena masih ada hasil penelitian pemberian deksametason dosis tinggi yang masih meningkat (jumlah eritrosit dan kadar Hb).
2. Perlu kajian lebih lanjut tentang mekanisme kerja dan peranan fisiologis reseptor glukokortikoid yang terletak pada sumsum tulang dan lien tikus yang berhubungan dengan proses *erythropoiesis*.
3. Perlu kajian lebih lanjut pemeriksaan sumsum tulang dan lien tikus akibat aktifitas reseptor glukokortikoid.
4. Pemberian terapi alergi menggunakan deksametason dosis tinggi dalam waktu lama perlu memperhatikan dosis dan waktu pemberian sehingga

tidak menimbulkan efek yang merugikan pada pasien berupa penurunan produksi eritrosit.

## DAFTAR PUSTAKA

- Bauer A, Tronche F, Wessely O, Kellendonk C, Reichardt HM, Steinlein P, Schütz G and Beug H, 1999. The glucocorticoid receptor is required for stress erythropoiesis. *Genes & Dev.* 13: 2996-3002.
- Bennett V, Baines A. 2001. Spectrin and ankyrin based pathways: metazoan inventions for integrating cell into tissues. *Physiol Rev* 8:1353-1392.
- Beutler E, Lichtman MA, Coller BS, Kipps TJ, 1995. Williams hematology. 8th ed. New York: McGraw-Hill. Inc, pp 211-223, 349-367, 406-415, 425-465.
- Broberg CS, Giraud GD, Schultz JM, 2003. Fetal anemia leads to augmented contractile response to hypoxic stress in adulthood. *Am J Physiol* 285:649-655.
- Broudy VC, Lin NL, Priestley GV, Nocka K, and Wolf NS, 1996. Interaction of Stem Cell Factor and Its Receptor c-kit Mediates Lodgment and Acute Expansion of Hematopoietic Cells in the Murine Spleen. *The Journal of The American Society of Hematology* 88: 75-81
- Campbell DT, Stanley JC, 1966. Experimental and quasi experimental design for research. Chicago, Rand Mc Nally Co, pp 53-55
- Chou JY, 1983. Temperature- sensitive adult liver cell line dependent on glucocorticoid for differentiation. *Moll Cell Biol* 3 (6): 1013-1020.
- Chrousos GP dan Margioris AN, 2002. Adrenokortikosteroid dan antagonis adrenokortikal. In (Katzung BG, eds). Terjemahan oleh bagian Farmakologi Universitas Airlangga. Jakarta: Salemba Medika, 575-603.
- Clark MR, 1988. Senescence of red blood cells: Progress and problems. *Physiol Rev* 68:503-564.
- Dolznic H, Habermann B, Stangl K, Deiner EM, Moriggl R, Beug H, and Mullner EW, 2002. Apoptosis protection by the Epo target Bcl-X(L) allows factorindependent differentiation of primary erythroblasts. *Curr Biol* 12(13): 1076-85.



- Farris EJ, Griffith JQ, 1962. *The rat in laboratory investigation*. 2<sup>nd</sup>. New York: Hafner Publishing Co, pp 343, 406-411, 414,417-419.
- Fisher JW, 1977. *Kidney hormones*. Vol II. London. Academic press, pp 387-411,423-427.
- Fox EL, Bowers RW and Foss ML, 1993. *The Physiological Basis of Exercise and Sport*. 5<sup>th</sup> edition, Iowa: Brown & Benchmark, pp 330-331.
- Ganong WF, 2005. *Review of Medical Physiological*. 20<sup>th</sup> Ed. New York: Lange Medical Books/McGraw Hill Medical Publishing Division, pp 356-381, 532-537.
- Goldfien A, 2001. *Adrenocorticosteroid and adrenocortical antagonist*. In ( Katzung BG, eds). *Basic and clinical pharmacology*, 8<sup>th</sup> edition . California: Lange Medical Publications, pp 660-678.
- Goodman LS, Gilman A, Hardman JG, Limbird LE, dan Gilman AG, 2001. *Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutic*. New York: MC Graw-Hill, pp 1649-1676.
- Greenspan FS, Baxter JD, 2000. *Basic and clinical endocrinology*. 4<sup>th</sup> Ed. New York: Connecticut Appleton & hange, pp 362-410.
- Guyton AC, Hall JE, 2006. *Textbook of Medical Physiology*, 10<sup>th</sup> Ed, Philadelphia: WB Saunders Co, pp 419-428, 944-960
- Kolbus A, Bla'zquez M-Domingo, Carotta S, Bakker W, Luedemann S, Lindern M, Steinlein P, and Beug H, 2003. *Cooperative signaling between cytokine receptors and the glucocorticoid receptor in the expansion of erythroid progenitors: molecular analysis by expression profiling*. *Blood* 102:3136-3146.
- Krantz SB, 1991. *Erythropoietin*. *Blood* 77: 419-434
- Lee GR, Foerster J, Lukens J, 1999. *Wintrobe's Clinical Hematology*, 10<sup>th</sup>Ed., vol. 1, Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins-A Wolters Kluwer Co, pp 134-152.

- Leung P, Gidari AS, 1985. Effect of dexamethasone on fetal liver erythroid colony-forming cells in vivo. *Exp Hematol* 13(9): 906-11.
- Malgor LA, Barrios L, Albarenque MV, Verges E, Markowsky EE, Montiel E, and Mussin SM, 1987. Erythropoietic action of dexamethasone on the anemia associated with an experimental chronic renal failure. *Acta Physiol Pharmacol Latinoam* 37(3): 365-76.
- Martindale W, 1993. *Martindale The Extra Pharmacopoeia*. London: The Pharmaceutical Press, pp 728-729
- McKnight, Lee DG, Palmiter RD, 1980. Transferrin Gene Expression, Regulation Of mRNA Transcription In Chick Liver By Steroid hormones and iron Deficiency. *The journal of Biological Chemistry* 255: 148-153
- Pacak K, Palkovits M. Stressor specificity of central neuroendocrine responses: Implications for stress-related disorders. *Endo Rev* 22: 502-548, 2001.
- Papaconstantinou J, Stewart JA, Rabek JP, McClintock PR, Wong EY, 1983. Glucocorticoids inhibit the coordinated translation of alpha- and beta-globin mRNAs in Friend erythroleukemia cells. *Arch Biochem Biophys*. 227(2):542-51.
- Price SA, Wilson, LM, 2006. *Patofisiologi: Konsep klinis proses-proses penyakit*. Terjemahan oleh Pendit BU. Jakarta: EGC, pp 255-267.
- Pudjirahardjo WJ, Poemono H, Machfoed MH, 1993. *Metode Penelitian dan statistik terapan*. Surabaya: Airlangga University Press, hal 57-58.
- Reksodiputro AH, 1994. Mekanisme anemi defisiensi besi. *Cermin Dunia Kedokteran* . 95:5-9.
- Rengganis I, 2006. Penggunaan dan Efek Samping Steroid. *Cermin Dunia Kedokteran*. 150: 42-46.
- Setyawan, 1996. Pengaruh latihan fisik aerobik dan anaerobik terhadap respons ketahanan tubuh. Disertasi, Universitas Airlangga, Surabaya.

- Steinberg MH, Coleman MB, Garver FA, Grenett HE, Pressley A, JG Adams, 1981. Effects of dexamethasone on fetal hemoglobin synthesis in peripheral blood erythroid burst-forming units. *Am J Hematol*; 10(1): 37-45.
- Suherman, KS, 2000. Adrenokortikotropin, adrenokortikosteroid, analog sintetik dan antagonisnya. In: (Ganiswara SG, eds). *Farmakologi dan terapi*. Edisi 4. Bagian Farmakologi fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, hlm 482-500.
- Szygula Z, 1990. Erythrocytic system and exercise. *Sports med* 10:181-197.
- Viru A and Smirnova T, 1995. Health promotion and exercise training. *Sports Med* 19(2):121
- Voet D, Voet JG, 1995. *Biochemistry*. 2<sup>nd</sup> ed. New York: John Wiley & Sons, Inc, pp 1276-1289.
- Von Lindern, Zauner W, Mellitzer G, Steinlein P, Fritsch G, Huber K, wenberg BL, and Beug H, 1999. The Glucocorticoid Receptor Cooperates With the Erythropoietin Receptor and c-Kit to Enhance and Sustain Proliferation of Erythroid Progenitors In Vitro. *Blood* 94: 550-559
- Weisberg RB, Bruce SE, Machan JT, 2002. Nonpsychiatric illness among primary care patients with trauma histories and posttraumatic stress disorder. *Psychiatric Services* 53:848-854.

**Lampiran 1****Perhitungan Besar Sampel Penelitian**

Besar sampel minimal ditentukan dengan menggunakan rumus dari Pudjirahardjo (1993), sebagai berikut:

$$n = \frac{1}{1-f} \times \frac{(Z_{\alpha} + Z_{\beta})^2 \cdot Q_d^2}{\delta^2}$$

Kemungkinan hewan coba mati kecil, sehingga digunakan  $f=10\%$

$$\begin{aligned} n &= \frac{1}{1-10\%} \times (1,65 + 0,824)^2 \\ &= 1,11 \times (2,47)^2 \\ &= 6,77 \\ &= 7 \end{aligned}$$

**Keterangan:**

$n$  = besar sampel

$Z_{\alpha}$  = harga standar  $\alpha$  0,05 adalah 1,65

$Z_{\beta}$  = harga standar  $\beta$  0,2 adalah 0,824

$Q_d$  = simpangan baku

$\delta$  = beda mean kelompok kontrol dan perlakuan

$f$  = proporsi kegagalan

$$\frac{Q_d^2}{\delta^2} = 1$$

(Pudjirahardjo, 1993).

## Lampiran 2

### Pemberian dosis deksametason

#### 2.1 Dosis pemberian

Dosis tinggi deksametason yang digunakan 1mg / 200 g BB / hari (Leung, 1985).

Dosis rendah deksametason adalah 0,1 mg / 200 g BB / hari (Malgor, 1987).

Volume yang diinjeksikan adalah 0,1 ml karena volume maksimal yang dapat diberikan pada tikus (Ritchel 1974 cit Kusumawati, 2003) adalah 0,2 ml / 200 g BB.

#### 2.2 Pengenceran

Sediaan deksametason yang digunakan berupa larutan deksametason natrium fosfat dengan konsentrasi 20 mg / ml deksametason, sediaan dalam ampul 1 ml. Dilakukan pengenceran sehingga didapatkan dosis yang diinginkan.

#### Dosis tinggi:

$$M1 V1 = M2 V2$$

$$\frac{20mg}{1ml} \times 1ml = \frac{1mg}{0,1ml} \times V2$$

$$V2 = 2 ml$$

Jadi untuk mendapatkan dosis injeksi deksametason yang sesuai dilakukan pengenceran satu ampul deksametason ditambah dengan 1 ml *normal saline*, diinjeksikan sebanyak 0,1ml / 200 g BB tikus.

**Untuk dosis rendah:**

$$M1 V1 = M2 V2$$

$$\frac{20mg}{1ml} \times 1ml = \frac{0,1mg}{0,1ml} \times V2$$

$$V2 = 20 \text{ ml}$$

Jadi untuk mendapatkan dosis injeksi deksametason yang sesuai dilakukan pengenceran satu ampul deksametason ditambah dengan 19 ml *normal saline*, diinjeksikan sebanyak 0,1ml / 200 g BB tikus.

### 2.3 Pelaksanaan Pemberian Deksametason

Pemberian injeksi intramuskular pada hewan coba dilaksanakan berdasarkan berat badan hewan coba. Pada penelitian ini berat badan hewan coba yang digunakan adalah 180-210 gram. Sehingga pemberian dosis deksametason setelah diencerkan adalah :

$\text{Pemberian deksametason} = \frac{\text{BB hewan coba}}{200 \text{ g BB}} \times 0,1 \text{ ml}$
---

Dosis pemberian selengkapnya dapat dilihat pada tabel 2.1 di bawah ini :

**Tabel 2.1. Pelaksanaan pemberian dosis injeksi deksametason**

Berat badan hewan coba	Dosis pemberian injeksi deksametason
180 – <200 g	$0,9 \cdot 10^{-1} \text{ ml}$
200 - 210 g	$1 \cdot 10^{-1} \text{ ml}$

### Lampiran 3. Pemeriksaan Retikulosit

Pemeriksaan : Hitung Retikulosit

Alat : (Manual)

Prinsip Kerja : Retikulosit adalah eritrosit muda yang masih mengandung sisa-sisa inti RNA dan biasanya lebih besar dari eritrosit dan akan terbentuk retikulum yang berwarna biru bila diwarnai dengan metilen blue (didalamnya mengandung substansi basofil).

Cara Kerja:

1. Masukkan 50  $\mu\text{L}$  larutan *Briliantcresylblue* (BCB) 1% ke dalam tabung kecil.
2. Campurkan 50  $\mu\text{L}$  darah ke dalam tabung di atas, inkubasi 30-60 menit pada 37°C.
3. Campuran tersebut dihomogenkan kembali, ambil setetes darah untuk membuat sediaan hapus, biarkan kering di udara.
4. Periksa dengan minyak imersi (perbesaran 1000x) dan hitung jumlah retikulosit yang terlihat per 1000 eritrosit.

Perhitungan :

$$\% \text{ Retikulosit} = \frac{\text{Jumlah Retikulosit}}{\text{Jumlah Eritrosit}} \times 100\%$$

## Lampiran 4

## Data Hasil Pengukuran Retikulosit, Eritrosit, Hemoglobin dan Hematokrit

Kelompok	No	Variabel			
		Retikulosit (%)	Eritrosit ( $10^6/\mu\text{L}$ )	Hemoglobin (g/dL)	Hematokrit (%)
K <sub>0</sub> (tanpa perlakuan, data pretest)	1	3.80	7.39	13.8	36.9
	2	0.90	8.39	14.6	40.8
	3	0.60	8.13	15.0	42.2
	4	1.40	8.71	16.6	46.0
	5	1.70	8.26	15.1	42.8
	6	1.70	8.20	15.0	43.0
	7	1.90	8.10	15.2	42.2
K <sub>I</sub> (injeksi deksametason dosis rendah)	1	2.40	8.77	15.7	42.0
	2	4.00	8.60	16.3	43.9
	3	3.80	8.23	16.1	42.5
	4	2.70	8.77	15.2	44.4
	5	2.70	8.91	14.7	42.6
	6	2.60	8.43	14.3	42.5
	7	3.30	9.28	15.7	45.7
K <sub>II</sub> (injeksi deksametason dosis tinggi)	1	1.70	8.79	16.4	41.9
	2	2.20	8.38	13.2	38.6
	3	1.40	9.16	17.3	45.2
	4	1.90	8.78	14.9	43.1
	5	2.30	8.34	14.5	42.1
	6	1.40	9.13	15.0	42.5
	7	1.30	7.87	14.7	40.5
K <sub>III</sub> (injeksi normal saline)	1	2.10	8.01	14.3	43.7
	2	3.70	8.59	14.8	42.8
	3	4.30	7.50	12.6	38.0
	4	3.00	8.05	13.3	39.8
	5	1.90	8.16	13.0	38.7
	6	3.30	8.20	13.8	39.8
	7	1.20	9.24	15.2	45.0

## Keterangan:

- $\mu\text{L}$  = mikroliter ( $10^{-6}$  liter)  
g = gram  
dl = desiliter ( $10^{-1}$  liter)

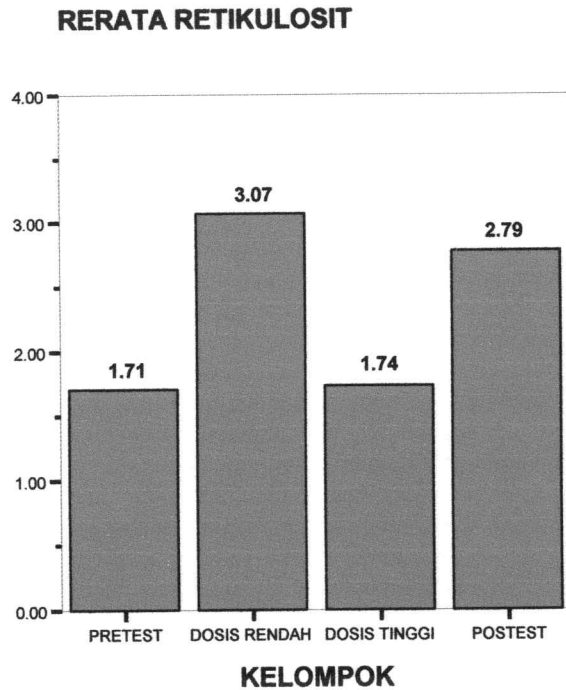


## Lampiran 5

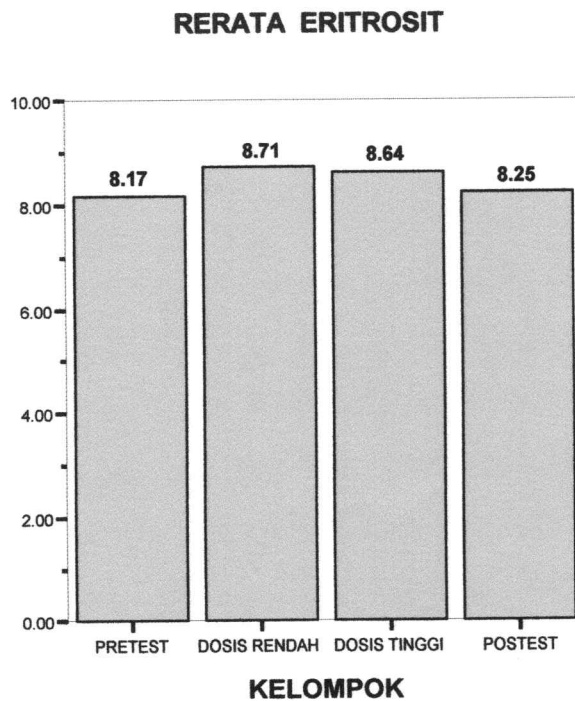
## Hasil Analisis Deskriptif Kelompok

## Descriptives

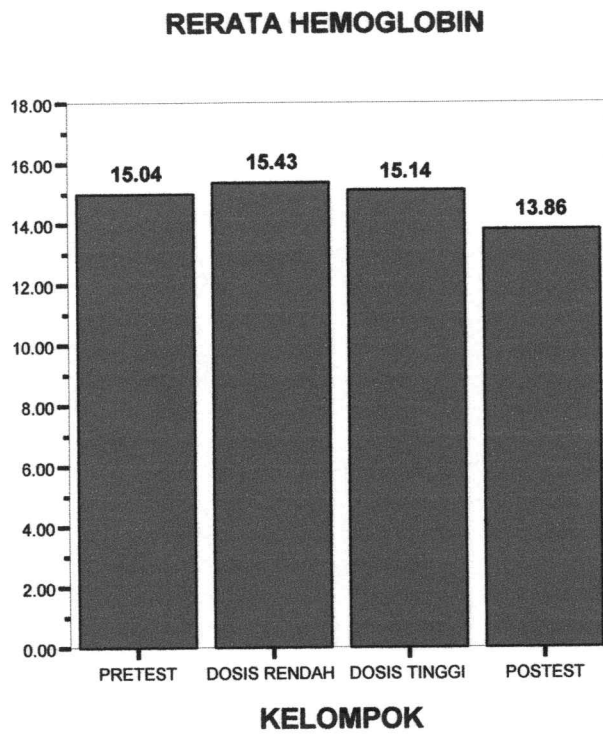
		N	Mean	Std. Deviation
RETIKULOSIT	PRETEST	7	1.7143	1.03187
	DOSIS RENDAH	7	3.0714	.63170
	DOSIS TINGGI	7	1.7429	.40356
	POSTEST	7	2.7857	1.09610
	Total	28	2.3286	1.00622
ERITROSIT	PRETEST	7	8.1686	.40081
	DOSIS RENDAH	7	8.7129	.33984
	DOSIS TINGGI	7	8.6357	.46601
	POSTEST	7	8.2500	.54259
	Total	28	8.4418	.48242
HEMOGLOBIN	PRETEST	7	15.0429	.83638
	DOSIS RENDAH	7	15.4286	.73193
	DOSIS TINGGI	7	15.1429	1.33524
	POSTEST	7	13.8571	.95892
	Total	28	14.8679	1.11755



Gambar 5.1 Diagram hasil penelitian rerata jumlah retikulosit (%)



Gambar 5.2 Diagram hasil penelitian rerata jumlah eritrosit ( $10^6/\mu\text{L}$ )



Gambar 5.3 Diagram hasil penelitian rerata kadar Hb (g/dL)

## Lampiran 6

## Hasil uji Normalitas Distribusi

## KELOMPOK = PRETES

## One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		RETIKULOSIT	HB	ERITROSIT
N		7	7	7
Normal Parameters <sup>a,b</sup>	Mean	1.7143	15.0429	8.1686
	Std. Deviation	1.03187	.83638	.40081
Most Extreme Differences	Absolute	.286	.283	.289
	Positive	.286	.283	.147
	Negative	-.140	-.194	-.289
Kolmogorov-Smirnov Z		.756	.748	.765
Asymp. Sig. (2-tailed)		.617	.631	.602

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

c. KELOMPOK = PRETES

## KELOMPOK = DOSIS RENDAH

## One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		RETIKULOSIT	HB	ERITROSIT
N		7	7	7
Normal Parameters <sup>a,b</sup>	Mean	3.0714	15.4286	8.7129
	Std. Deviation	.63170	.73193	.33984
Most Extreme Differences	Absolute	.293	.216	.148
	Positive	.293	.126	.148
	Negative	-.161	-.216	-.138
Kolmogorov-Smirnov Z		.776	.572	.390
Asymp. Sig. (2-tailed)		.584	.899	.998

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

c. KELOMPOK = DOSIS RENDAH

**KELOMPOK = DOSIS TINGGI****One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test**

		RETIKULOSIT	HB	ERITROSIT
N		7	7	7
Normal Parameters <sup>a,b</sup>	Mean	1.7429	15.1429	8.6357
	Std. Deviation	.40356	1.33524	.46601
Most Extreme Differences	Absolute	.231	.257	.193
	Positive	.231	.257	.137
	Negative	-.157	-.172	-.193
Kolmogorov-Smirnov Z		.611	.680	.511
Asymp. Sig. (2-tailed)		.850	.745	.957

- a. Test distribution is Normal.  
 b. Calculated from data.  
 c. KELOMPOK = DOSIS TINGGI

**KELOMPOK = POSTEST****One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test**

		RETIKULOSIT	HB	ERITROSIT
N		7	7	7
Normal Parameters <sup>a,b</sup>	Mean	2.7857	13.8571	8.2500
	Std. Deviation	1.09610	.95892	.54259
Most Extreme Differences	Absolute	.163	.148	.251
	Positive	.163	.148	.251
	Negative	-.149	-.123	-.186
Kolmogorov-Smirnov Z		.431	.391	.664
Asymp. Sig. (2-tailed)		.992	.998	.770

- a. Test distribution is Normal.  
 b. Calculated from data.  
 c. KELOMPOK = POSTEST

## Lampiran 7

## Hasil Penimbangan Berat badan Tikus

(Gram)

Tikus	K <sub>0</sub>	K <sub>I</sub>	K <sub>II</sub>	K <sub>III</sub>
1	180	195	185	200
2	203	194	199	198
3	199	190	210	202
4	203	184	199	180
5	199	195	186	202
6	190	205	190	183
7	185	190	205	185

## ANOVA

Berat badan

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	48.857	3	16.286	.208	.890
Within Groups	1876.571	24	78.190		
Total	1925.429	27			

**Lampiran 8****Hasil uji homogenitas hematokrit****ANOVA****HEMATOKRIT**

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	18.294	3	6.098	1.170	.342
Within Groups	125.060	24	5.211		
Total	143.354	27			

## Lampiran 9

Hasil analisis  $K_{III} - K_0$ 

## Descriptive Statistics

KELOMPOK		Mean	Std. Deviation	N
RETIKULOSIT	PRETEST	1.7143	1.03187	7
	POSTEST	2.7857	1.09610	7
	Total	2.2500	1.16404	14
ERITROSIT	PRETEST	8.1686	.40081	7
	POSTEST	8.2500	.54259	7
	Total	8.2093	.46023	14
HEMOGLOBIN	PRETEST	15.0429	.83638	7
	POSTEST	13.8571	.95892	7
	Total	14.4500	1.06102	14

## Multivariate Tests

	Value	F	Hypothesis df	Error df	Sig.
Pillai's trace	.797	13.087 <sup>a</sup>	3.000	10.000	.001
Wilks' lambda	.203	13.087 <sup>a</sup>	3.000	10.000	.001
Hotelling's trace	3.926	13.087 <sup>a</sup>	3.000	10.000	.001
Roy's largest root	3.926	13.087 <sup>a</sup>	3.000	10.000	.001

a. Exact statistic

## Univariate Tests

Dependent Variable		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
RETIKULOSIT	Contrast	4.018	1	4.018	3.546	.084
	Error	13.597	12	1.133		
ERITROSIT	Contrast	.023	1	.023	.102	.755
	Error	2.730	12	.228		
HEMOGLOBIN	Contrast	4.921	1	4.921	6.079	.030
	Error	9.714	12	.810		



## Lampiran 10

## Data Koreksi

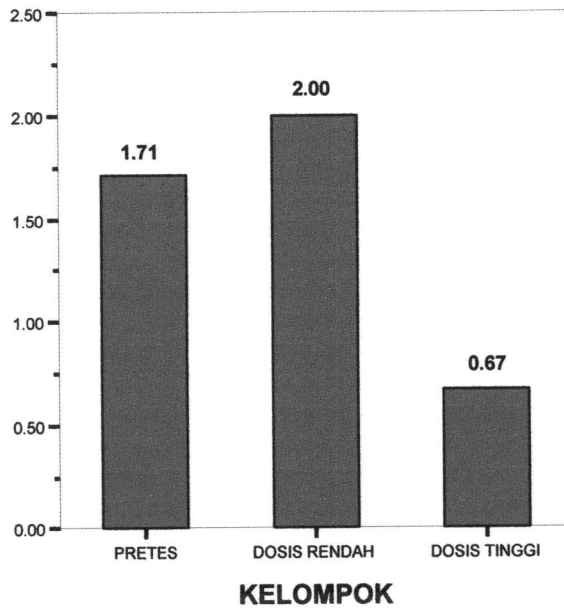
Kelompok	No	Variabel		
		Retikulosit (%)	Eritrosit ( $10^6/\mu\text{L}$ )	Hemoglobin (g/dL)
K <sub>0</sub> (tanpa perlakuan, data pretest)	1	3.80	7.39	13.8
	2	0.90	8.39	14.6
	3	0.60	8.13	15.0
	4	1.40	8.71	16.6
	5	1.70	8.26	15.1
	6	1.70	8.20	15.0
	7	1.90	8.10	15.2
K <sub>I</sub> (Injeksi deksametason dosis rendah)	1	1.33	8.69	16.89
	2	2.93	8.52	17.49
	3	2.73	8.15	17.29
	4	1.63	8.69	16.39
	5	1.63	8.83	15.89
	6	1.53	8.35	15.49
	7	2.23	9.20	16.89
K <sub>II</sub> (injeksi deksametason dosis tinggi)	1	.63	8.71	17.59
	2	1.13	8.30	14.39
	3	.33	9.08	18.49
	4	.83	8.70	16.09
	5	1.23	8.26	15.69
	6	.33	9.05	16.19
	7	.23	7.79	15.89

## Lampiran 11

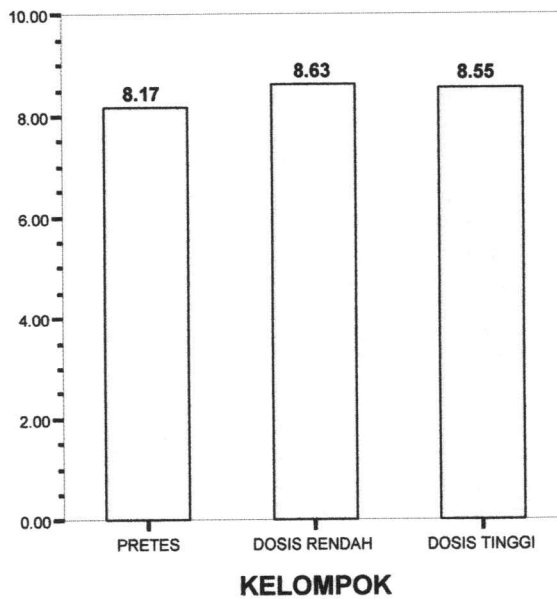
## Hasil analisis deskriptif data koreksi

## Descriptive Statistics

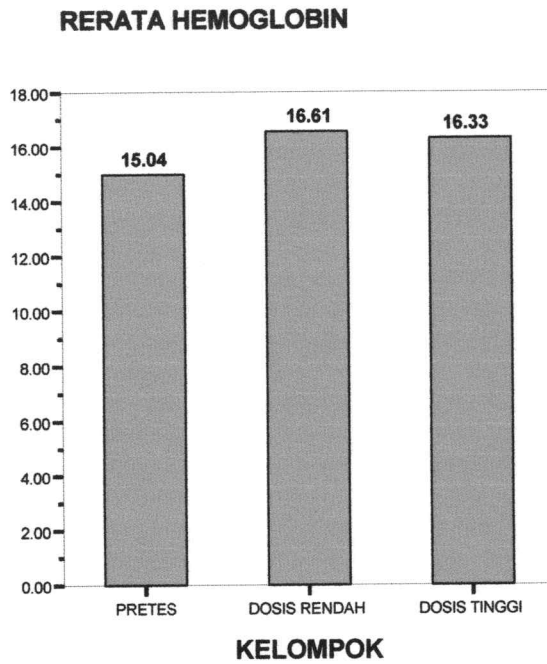
	KELOMPOK	Mean	Std. Deviation	N
RETIKULOSIT	PRETES	1.7143	1.03187	7
	DOSIS RENDAH	2.0000	.63170	7
	DOSIS TINGGI	.6715	.40356	7
	Total	1.4619	.91122	21
ERITROSIT	PRETES	8.1686	.40081	7
	DOSIS RENDAH	8.6315	.33984	7
	DOSIS TINGGI	8.5543	.46601	7
	Total	8.4514	.43708	21
HB	PRETES	15.0429	.83638	7
	DOSIS RENDAH	16.6144	.73193	7
	DOSIS TINGGI	16.3287	1.33524	7
	Total	15.9953	1.18151	21

**RERATA RETIKULOSIT**

Gambar 5.4 Diagram hasil penelitian rerata jumlah retikulosit data koreksi (%)

**RERATA ERITROSIT**

Gambar 5.5 Diagram hasil penelitian rerata jumlah eritrosit data koreksi ( $10^6/\mu\text{L}$ )



Gambar 5.6 Diagram hasil penelitian rerata kadar Hb data koreksi (g/dL)

## Lampiran 12

## Hasil uji Normalitas Distribusi Data Koreksi

## KELOMPOK = PRETES

## One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		RETIKULOSIT	ERITROSIT	HB
N		7	7	7
Normal Parameters <sup>a,b</sup>	Mean	1.7143	8.1686	15.0429
	Std. Deviation	1.03187	.40081	.83638
Most Extreme Differences	Absolute	.286	.289	.283
	Positive	.286	.147	.283
	Negative	-.140	-.289	-.194
Kolmogorov-Smirnov Z		.756	.765	.748
Asymp. Sig. (2-tailed)		.617	.602	.631

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

## KELOMPOK = DOSIS RENDAH

## One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		RETIKULOSIT	ERITROSIT	HB
N		7	7	7
Normal Parameters <sup>a,b</sup>	Mean	2.0000	8.6315	16.6144
	Std. Deviation	.63170	.33984	.73193
Most Extreme Differences	Absolute	.293	.148	.216
	Positive	.293	.148	.126
	Negative	-.161	-.138	-.216
Kolmogorov-Smirnov Z		.776	.390	.572
Asymp. Sig. (2-tailed)		.584	.998	.899

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

**KELOMPOK = DOSIS TINGGI****One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test**

		RETIKULOSIT	ERITROSIT	HB
N		7	7	7
Normal Parameters <sup>a,b</sup>	Mean	.6715	8.5543	16.3287
	Std. Deviation	.40356	.46601	1.33524
Most Extreme Differences	Absolute	.231	.193	.257
	Positive	.231	.137	.257
	Negative	-.157	-.193	-.172
Kolmogorov-Smirnov Z		.611	.511	.680
Asymp. Sig. (2-tailed)		.850	.957	.745

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

## Lampiran 13

## Hasil Analisis KI-K0

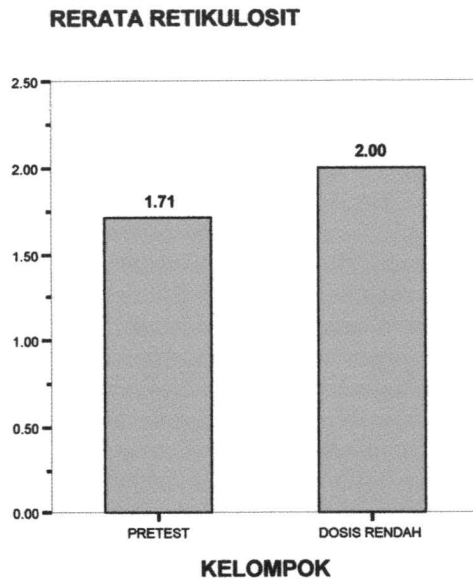
## Multivariate Tests

	Value	F	Hypothesis df	Error df	Sig.
Pillai's trace	.592	4.839 <sup>a</sup>	3.000	10.000	.025
Wilks' lambda	.408	4.839 <sup>a</sup>	3.000	10.000	.025
Hotelling's trace	1.452	4.839 <sup>a</sup>	3.000	10.000	.025
Roy's largest root	1.452	4.839 <sup>a</sup>	3.000	10.000	.025

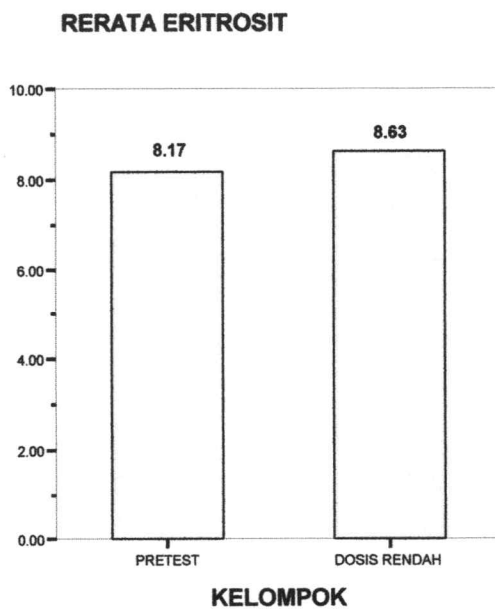
a. Exact statistic

## Univariate Tests

Dependent Variable		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
RETIKULOSIT	Contrast	.286	1	.286	.390	.544
	Error	8.783	12	.732		
ERITROSIT	Contrast	.750	1	.750	5.431	.038
	Error	1.657	12	.138		
HEMOGLOBIN	Contrast	8.644	1	8.644	13.995	.003
	Error	7.411	12	.618		

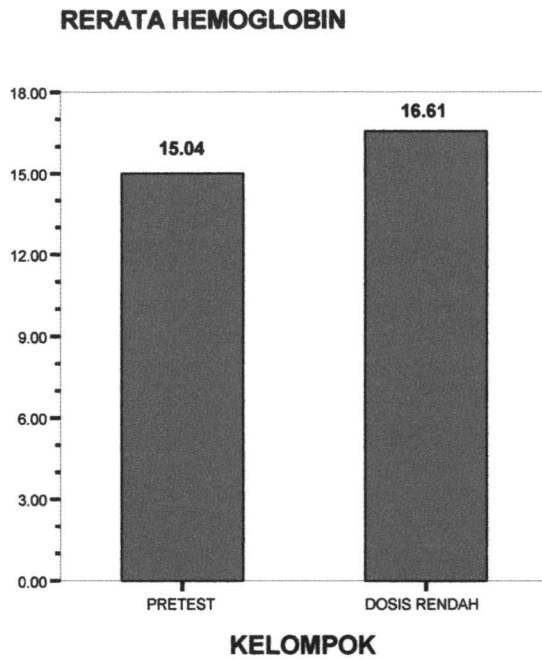


Gambar 13.1 Diagram hasil penelitian rerata jumlah retikulosit (%).



Gambar 13.2 Diagram hasil penelitian rerata jumlah eritrosit ( $10^6/\mu\text{L}$ ).





Gambar 13.3 Diagram hasil penelitian rerata kadar Hb (g/dL)

## Lampiran 14

## Hasil Analisis KII-K0

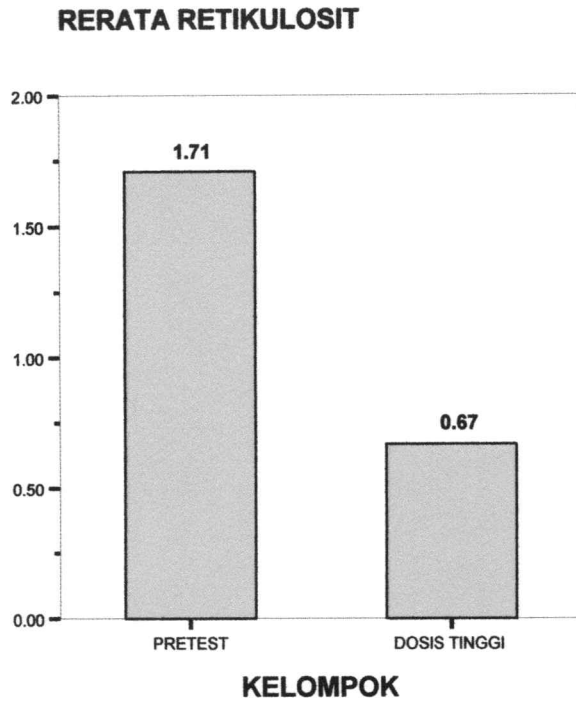
## Multivariate Tests

	Value	F	Hypothesis df	Error df	Sig.
Pillai's trace	.396	2.182 <sup>a</sup>	3.000	10.000	.153
Wilks' lambda	.604	2.182 <sup>a</sup>	3.000	10.000	.153
Hotelling's trace	.655	2.182 <sup>a</sup>	3.000	10.000	.153
Roy's largest root	.655	2.182 <sup>a</sup>	3.000	10.000	.153

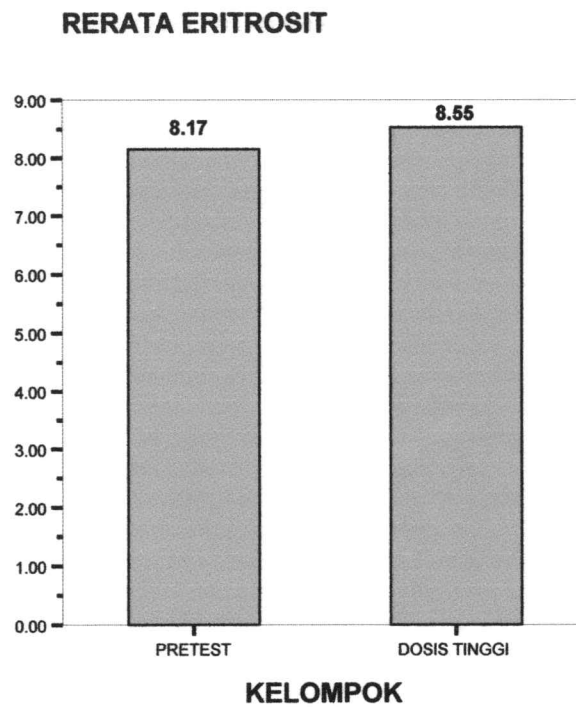
a. Exact statistic

## Univariate Tests

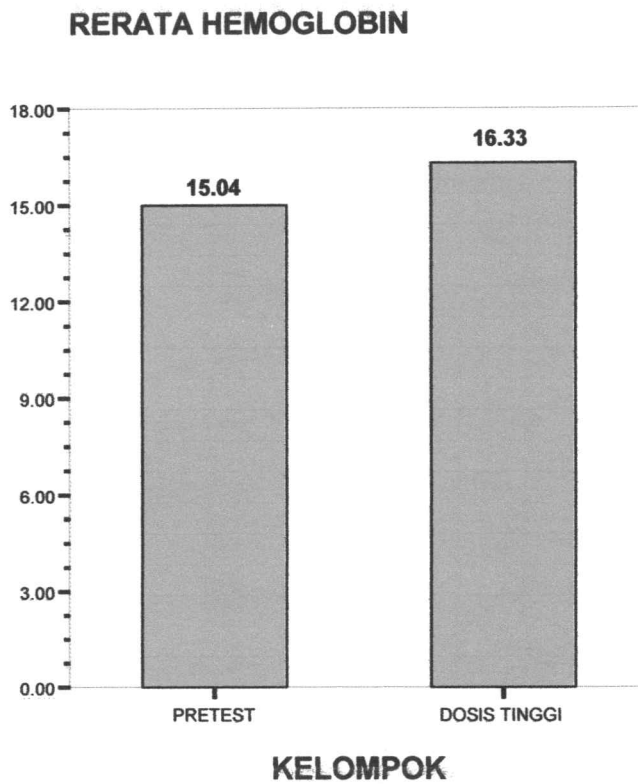
Dependent Variable		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
RETIKULOSIT	Contrast	3.806	1	3.806	6.201	.028
	Error	7.366	12	.614		
ERITROSIT	Contrast	.521	1	.521	2.757	.123
	Error	2.267	12	.189		
HEMOGLOBIN	Contrast	5.786	1	5.786	4.662	.052
	Error	14.894	12	1.241		



Gambar 14.1 Diagram hasil penelitian rerata jumlah retikulosit (%).



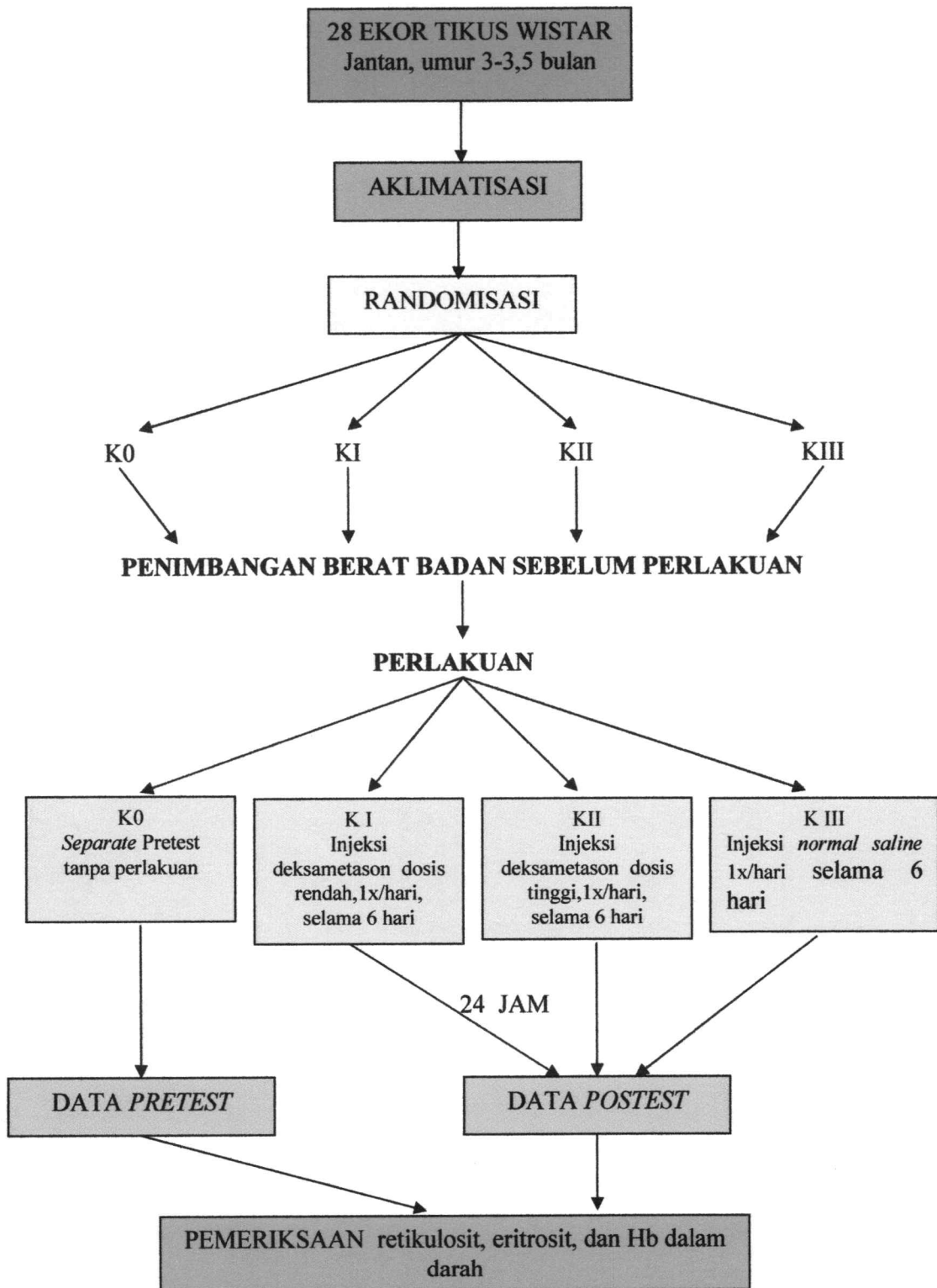
Gambar 14.2 Diagram hasil penelitian rerata jumlah eritrosit ( $10^6/\mu\text{L}$ ).



Gambar 14.3 Diagram hasil penelitian rerata Hb (g/dL)

Lampiran 15.

Alur Penelitian



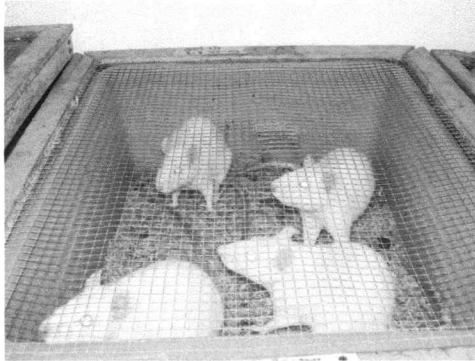
## Lampiran 16

## JADWAL PELAKSANAAN

Hari/tanggal	Perlakuan	Keterangan
Jumat, 15 juni	-Timbang BB, Pembagian Kelompok	Seluruh kelompok
	<b>AMBIL DARAH 2CC KELOMPOK K0, TIKUS K0 DIPOTONG</b>	
15 - 20 Juni	- Injeksi deksametason dosis rendah	K1
	- Injeksi deksametason dosis tinggi	K2
	- Injeksi <i>normal saline</i>	K3
Kamis, 21 Juni	<b>AMBIL DARAH 2CC KELOMPOK K1,K2,K3. TIKUS K1, K2, K3 DIPOTONG</b>	

## Keterangan:

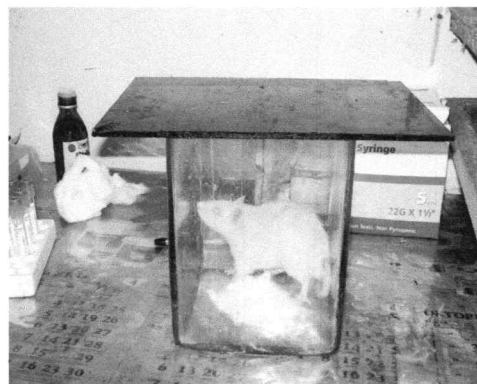
- Injeksi tiap jam 8 pagi
- Pengambilan darah jam 8 pagi
- K0 = *Separate Pretest*
- K1 = dosis rendah
- K2 = dosis tinggi
- K3 = Kontrol *post test*

**Lampiran 16****Gambar Penelitian**

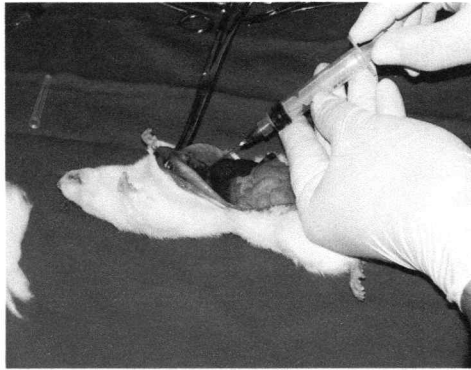
**Gambar 16.1** *Rattus norvegicus* galur *Wistar*



**Gambar 16.2** Penimbangan Hewan Coba



**Gambar 16.3** Pembiusan Hewan Coba



Gambar 4.5 Pengambilan darah hewan coba