

PENGARUH PENYUNTIKAN EKSTRAK
GINJAL ANJING TERHADAP SUMSUM
TULANG MERAH
SUATU STUDI PADA KELINCI



OLEH

DRH. ROBBY ISKANDAR TANUADJI

FAKULTAS PASCA SARJANA
UNIVERSITAS AIRLANGGA

1987

PENGARUH PENYUNTIKAN EKSTRAK
GINJAL ANJING TERHADAP SUMSUM
TULANG MERAH
SUATU STUDI PADA KELINCI

T E S I S

DIAJUKAN UNTUK MEMENUHI PERSYARATAN
PENDIDIKAN PASCASARJANA PROGRAM GELAR
PROGRAM STUDI IIMU KEDOKTERAN DASAR

OLEH

DRH. ROBBY ISKANDAR TANUADJI

NIM. 218310238

KETUA PROGRAM STUDI


Prof. dr. H. BAMBANG RAHINO S.

PEMBIMBING KETUA


Prof. Dr. LUKAS WIDIYANTO

K A T A P E N G A N T A R

Pada kesempatan ini pertama-tama perkenankanlah penulis mengucapkan puji syukur kehadiran Allah Yang Maha Pengasih dan Pemurah yang telah berkenan melimpahkan rahmatnya sehingga penulis dapat menyelesaikan tesis ini.

Dengan penuh kerendahan hati penulis ingin mengucapkan rasa hormat dan terima kasih yang setinggi-tingginya kepada :

1. Rektor Universitas Airlangga : Prof. Dr. R. Soedarmo Djojonegoro yang telah memberikan kesempatan kepada penulis untuk mengikuti pendidikan Pascasarjana.
2. Dekan Fakultas Pascasarjana Universitas Airlangga, Prof. Drg. R. Hartono yang telah memberi kesempatan kepada penulis untuk mengikuti pendidikan Pascasarjana.
3. Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga, Dr. H.S.M. Soeatmadji yang telah mengizinkan penulis untuk mengikuti pendidikan Pascasarjana serta mempergunakan fasilitas penelitian yang ada.
4. Kepala Laboratorium Ilmu Faal Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga, Dr. Moedjono yang telah memberikan kesempatan kepada saya untuk mengikuti pendidikan pada Fakultas Pascasarjana serta keleluasaan mempergunakan fasilitas yang ada di Laboratorium untuk menyelesaikan tesis ini.
5. Dr. Martin Setiabudi, Ph.D. yang telah banyak memberikan petunjuk, bimbingan serta dorongan bagi penulis dalam menyelesaikan tesis ini.

6. Prof. DR. R. Soekarnan, yang telah banyak memberikan bekal pendidikan, petuah yang bermanfaat kepada penulis dalam menempuh pendidikan Pascasarjana.
7. Dr. Muh. Cholil Munif, yang telah banyak membantu penulis dalam penelitian maupun pengolahan data hasil penelitian.
8. Dr. R.M. Tauhid Al-Amien, M.Sc. yang telah banyak membantu dalam penyempurnaan penulisan naskah tesis ini.
9. Kepala Laboratorium Patologi Klinik Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga, Drh. Soepartono, M.S. yang telah mengizinkan penulis mempergunakan fasilitas penelitian yang ada.
10. Drh. Budi Utomo, dosen Patologi Klinik Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga yang telah banyak membantu penulis dalam penelitian.
11. Seluruh Staf dan Karyawan di Laboratorium Ilmu Faal Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga, atas pengertian, dorongan, kerjasama dan bantuan yang telah penulis terima selama ini.
12. Guru-guru saya di Fakultas Pascasarjana yang telah memberikan bekal yang sangat bermanfaat untuk perkembangan ilmu pengetahuan penulis.

Tidak lupa kami ucapkan terima kasih kepada mereka-mereka yang tidak dapat kami sebutkan satu-persatu atas bantuan dan kerjasama yang telah diberikan selama ini.

Semoga Allah Yang Maha Pengasih dan Pemurah membalas semua kebaikan ini.

Surabaya, 15 Juli 1987

Penulis.

D A F T A R I S I

	Halaman
KATA PENGANTAR	1
DAFTAR ISI	111
BAB I PENDAHULUAN	1
BAB II MATERI DAN METODA	15
BAB III H A S I L	21
BAB IV PEMBAHASAN	30
BAB V KESIMPULAN	34
BAB VI RINGKASAN	35
BAB VII DAFTAR PUSTAKA	37
LAMPIRAN TABEL - TABEL	44

BAB I

I. PENDAHULUAN

Sudah jelas bahwa ginjal adalah tempat produksi Erythropoietin. Banyak bukti-bukti secara klinis maupun eksperimen yang menunjang hal ini. misalnya, pada pasien penderita tumor ginjal dan hidronefrosis, diketahui adanya peningkatan kadar Erythropoietin di plasma dan sebaliknya pada chronic renal disease didapatkan penurunan kadar Erythropoietinya (7, 23, 27, 28, 36, 45). Tetapi sampai sekarang kita masih belum tahu dengan tepat, sel ginjal yang mana yang menghasilkan Erythropoietin (4). Seperti yang telah diketahui, ginjal terdiri dari dua bagian yaitu : medulla dan cortex (24) dan widyante dan Hartomo telah berhasil membuat ekstrak dari medulla dan cortex ginjal anjing dan pada penyuntikan pada kelinci menyebabkan peningkatan jumlah Retikulosit (44). Berdasarkan hal-hal tersebut diatas, penulis tertarik untuk mengadakan penelitian, apakah penyuntikan ekstrak medulla ginjal anjing selain meningkatkan jumlah retikulosit dan jumlah erytrosit di darah perifer, juga betul-betul meningkatkan erythropoiesis. Dalam hal ini, penulis mengharapkan bahwa apabila ekstrak medulla ginjal memang betul mengandung Erythropoietin, maka penyuntikan ekstrak tersebut akan se-

nyebabkan peningkatan erythropoiesis yang terlihat dalam aktivitas sumsum tulang merah.

LANDASAN TEORI

Pada waktu, embryonal pembentukan sel darah merah dilakukan oleh yolk sac. Pada saat pertengahan semester ketiga dari masa kehamilan, organ utama pembentuk sel darah merah adalah hati, limpa dan kelenjar limpa. Dan pada akhir masa kehamilan, sel darah merah dihasilkan oleh sumsum tulang merah dari semua tulang, tetapi pada hewan dewasa hanya di sumsum merah tulang-tulang pipih (flat bone), tulang-tulang panjang hanya os humerus, os femur dan os tibia saja yang membentuknya (8, 24). Sel darah merah ini berasal dari " committed stem cell ". Di sumsum tulang merah " committed stem cell " ini mengadakan diferensiasi menjadi rubriblast (pronormoblast). Dalam proses ini, terjadi 3 kali pembelahan mitosis, dari bentuk rubriblast sampai menjadi rubricyte (poly - chromatophilic normoblast). Diperlukan kurang lebih 3 hari. Pada tahap metarubricyte, nucleus mengadakan kondensasi sehingga sel tersebut tidak mampu lagi mengadakan pembelahan mitosis. Sehari kemudian nucleus ini dikeluarkan dan sel tersebut menjadi retikulosit (6).

Hemoglobin

Struktur :

Hemoglobin terdiri dari Heme dan protein, yaitu :
globin.

Pembentukan hemoglobin :

Pembentukan hemoglobin dimulai dari pembentukan delta aminolevulinic acid, yang berasal dari glycine bereaksi dengan succinyl coenzyme A dan dibantu oleh vitamin B₆.

2 molekul delta aminolevulinic acid kemudian menjadi porphobilinogen dengan bantuan delta aminolevulinic acid dehydrase. Kemudian 4 molekul porphobilinogen deaminase dan uroporphyrinogen III dengan bantuan porphobilinogen deaminase dan uroporphyrinogen isomerase. Dengan adanya enzim uroporphyrinogen decarboxylase yang dapat memindahkan 4 gugusan carboxyl dari rantai asam asetat, terbentuklah coproperphyrinogen III.

Kemudian dibentuk protoporphyrin IX dari coproperphyrin III dengan bantuan coproperphyrinogen oksidase. Pada tahap ini 2 asam propionat diubah menjadi vinyl dan perubahan bentuk dari methylene menjadi methene.

Kemudian protoporphyrin IX mengikat besi (Fe) dengan bantuan enzim heme synthetase atau ferrochetalase membentuk molekul heme. Atom Fe ini terletak ditengah bentuk protoporphyrin IX dan dalam bentuk ferro akan mengikat oksigen.

Transport besi (Fe)

Besi di angkut dalam plasma terikat dengan suatu protein khusus yakni apotransferrin menjadi transferrin siderophyllin. (spesifik transport protein).

1 molekul transferrin mampu membawa 2 molekul besi.

Transferrin ini akan terikat pada sel darah merah dan kemudian melepaskan besi masuk melewati membran masuk kedalam sel darah merah. Didalam sel darah merah besi - berada dibagian mitochondria dan kemudian bereaksi dengan molekul protoporphyrin IX.

PEMBENTUKAN GLOBIN

Globin terbentuk di ribosome khusus yang berada di cytoplasma sel darah merah (6, 24).

Pemecahan sel darah merah

Pada waktu sel darah merah makin menua, terjadilah penurunan aktivitas enzim-enzymnya dan penurunan ATP. Pemecahan sel darah merah paling banyak terjadi di sumsum tulang merah oleh phagocytosis dari sel retikulo-endothelial. Setelah ini baru terjadi pemecahan hemoglobin. Pada pemecahan hemoglobin, besi dilepaskan dari ikatannya, untuk dipergunakan lagi dalam pembentukan sel darah merah yang baru. Sedangkan globinnya dikembalikan ke pool amino acid. Cincin protoporphyrin dipecah pada salah satu jembatan methene dan terbentuklah biliverdin. Biliverdin kemudian direduksi menjadi bilirubin.

Bilirubin dibawah oleh albumin plasma menuju kehati untuk di ekskresikan.

Bila hemoglobin langsung terlepas kedalam plasma, hemoglobin ini akan diikat oleh haptoglobin (suatu globulin) dan dibawa kembali ke sel retikulo-endothelial dan diproses seperti biasanya. Kemungkinan lain, hemoglobin yang bebas didarah akan di oksidasi menjadi methemoglobin, gugusan ini akan berikatan dengan hemo-peksin dikatabolisir. Dan meninggalkan sirkulasi. Dan bila terlalu banyak heme ada dalam plasma, sebagian akan diikat oleh albumin membentuk methemalbumin (25).

ABSORPSI BESI

Zat besi yang ada dalam makanan terdiri dari ikatan ionorganik yaitu ferri dan ferro. Dilembung, dibantu oleh pH yang asam, ikatan ini dipecah menjadi garam-garam ferri dan ferro anorganik. Bentuk ferri kemudian direduksi menjadi ferro (25). Pada manusia, absorpsi besi ini sangat dipengaruhi asam lambung. Bila sekresi asam lambung menurun atau setelah gastrektomi, absorpsi besi juga menurun. Dan pemberian asam ternyata memperbaiki penyerapan besi (31).

Setelah melalui lambung, sampai di usus halus, dalam suasana yang basa dibentuklah ferro-hydroxide. Ferro-hydroxide memasuki sel-sel mukosa usus halus dan di dalam sel-sel tersebut ferro-hydroxide di ubah menjadi ferri-hydroxide.

Ferri-hydroxide kemudian berikatan dengan protein, yaitu : apoferritin yang ada di dalam sel mukosa usus halus membentuk ferritin. Masih tetap di dalam sel mukosa usus halus, ferri-ion direduksi lagi menjadi ferro.

Dalam bentuk ferro ini zat besi keluar menuju ke sirkulasi portal dan apoferritin dilepaskan untuk mengangkut zat besi yang lain (25).

Duodenum dan jejunum adalah bagian usus halus yang paling tinggi daya serapnya terhadap zat besi, sedangkan ileum adalah bagian yang paling rendah daya serapnya - terhadap zat besi. Tetapi, bolus berada di ileum 20 kali lebih lama dari pada di duodenum dan jejunum, sehingga dapat disimpulkan bahwa zat besi diserap dalam 2 fase yang saling menunjang, yaitu : rapid fase (fase cepat) di duodenum dan jejunum dan slow fase (fase lambat) di ileum (20, 25).

Peranan ginjal pada pembentukan sel darah merah

Erythropoietin

Erythropoietin ginjal (renal), adalah suatu hormon yang mengendalikan pembentukan sel darah merah dan dibuat oleh ginjal. Erythropoietin ini adalah suatu glikoprotein yang mempunyai berat molekul antara 39000 sampai 70000. Terdiri dari : 26 % karbohidrat dan 74 % protein.

Karbohidratnya terdiri dari :

- 10 % sialic acid
- 6 % galactose
- 4 % manose
- 44 % glucosamine
- 2 % glucosa (29).

Sedangkan amino acidnya terdiri dari :

- aspartic acid 9,5 %
- threonine 6,9 %
- serine 6,4 %
- glutamic acid 12,5 %
- proline 11,1 %
- glycine 6,2 %
- alanine 7,2 %
- valine 5,8 %
- methionine 1,4 %
- isoleucine 5,4 %
- tyrosine 3,0 %
- phenylalanine 2,3 %
- histidine 2,0 %
- lysine 3,6 %
- arginine 3,6 %

(21).

Tempat kerja erythropoietin

Filmanoswics dan Gourney, menggunakan tikus - tikus yang telah dibuat tidak mempunyai erythroblast dengan

jalan membori transfusi dengan sel darah merah yang berlebihan. Hewan-hewan ini disuntik dengan erythropoietin dan terlihatlah proerythroblast dalam jumlah besar di limpa.

Dari hal ini, simpulkan bahwa erythropoietin bekerjanya pada " primitive precursor stem cell ". Setelah 50 sampai 75 jam, terjadi penurunan jumlah proerythroblast dan mulai terlihat basophilic erythroblast, polychromatophilic erythroblast, dan orthochromatic erythroblast. Tetapi, bila aktivitas erythropoietin ini segera dihentikan dengan memberikan erythropoietin antibody (anti erythropoietin), terlihat pendewasaan erythroblast ini tetap berlangsung terus. Hal ini menunjukkan erythropoietin tidak diperlukan untuk meneruskan pendewasaan erythroblast (29).

Mekanisme kerja erythropoietin

Erythropoietin bekerja pada sel-sel sumsum tulang merah, meningkatkan fraksi-fraksi RNA, RNA 150 S, 55 S sampai 65 S, 45 S, 9 S, 6 S dan 4 S.

Peningkatan RNA 150 S terjadi 15 menit setelah pemberian erythropoietin. Setelah RNA 150 S terbentuk, maksimum dalam 4 sampai 6 jam, setelah RNA ini terbentuk, barulah terjadi peningkatan sintesa DNA.

Gross & Coldwasser memperlihatkan hambatan pada sintesa DNA dengan menghambat peningkatan RNA yang dirangsang - oleh erythropoietin.

Hambatan dengan cycloheximide hanyalah menghasilkan hambatan yang kecil sekali. Tetapi, hambatan pada sintesa RNA dengan menggunakan aktinomycin D ternyata juga menghambat sintesa DNA dan sintesa hemoglobin.

Jadi, terlihat disini, peningkatan sintesa RNA tersebut adalah " primary nuclear event " dalam kerja hormon erythropoietin ini.

Dengan membandingkan besarnya berat molekul erythropoietin terhadap kecepatan efeknya dapat diperkirakan - erythropoietin bekerjanya lewat suatu " intermediate - cellular chemical ". Erythropoietin akan mengadakan interaksi dengan " cytoplasmic membrane " untuk menghasilkan second messenger. Tetapi, penelitian - penelitian lebih jauh membuktikan bahwa second messenger tersebut bukanlah cyclic AMP. Hal ini dibuktikan oleh Chang & Goldwasser, dengan menggunakan " rat fetal liver erythroid " yang diberi erythropoietin, ternyata tidak terdapat peningkatan maupun penurunan cyclic AMP walaupun setelah 5 sampai 30 menit terjadi pembentukan hemoglobin dalam jumlah besar (29).

Ginjal sebagai penghasil erythropoietin

Bahwa erythropoietin dihasilkan oleh ginjal, itu sudah jelas. Dalam hal ini, orang pertama yang berhasil membuktikan adalah Jacobson. Jacobson menggunakan tikus dan kelinci yang dinerrektomi lalu dihadapkan pada keadaan hypoxia dan diberi Cobalt, ternyata tidak ada

response terhadap rangsangan tadi. Secara tidak langsung dapat disimpulkan organ yang diambil yaitu ginjal yang menghasilkan erythropoietin (20).

Hasil dari Jacobson ini segera diikuti oleh peneliti-peneliti lain. Peschle, juga menggunakan tikus-tikus yang telah dinefrektomi kemudian ditempatkan pada keadaan hypoxia, 1 jam, 6 jam, 12 jam, 18 jam, dan 24 jam setelah nefrektomi. Didapatkannya penurunan kadar erythropoietin pada 1 jam, 6 jam, dan 12 jam setelah nefrektomi. Tidak ada perubahan kadar erythropoietin pada 18 jam dan 24 jam setelah nefrektomi.

Naets, 1960, mendapatkan, pada anjing, hilangnya seluruh erythroblast pada sumsum tulang merah setelah dilakukan bilateral nefrektomi. Kemungkinan, pada anjing ginjal merupakan satu-satunya organ penghasil erythropoietin (32). Peneliti lain juga mendapatkan hal yang sama.

Huirhead, 1960, menggunakan anjing sebagai hewan percobaan dan diberi perlakuan yang sama yaitu bilateral nefrektomi dan mendapatkan adanya penurunan yang drastis pada " radioiron incorporation " pada pembentukan sel darah merah yang baru di darah perifer. Sedangkan pada species lain, seperti tikus, kelinci dan tamarin masih memperlihatkan sedikit erythropoiesis bila nefrektomi bilateral dilakukan dan dihadapkan pada rangsangan hypoxia. Juga berbeda dengan anjing, pada manusia yang sedang menunggu transplantasi ginjal dan kedua ginjalnya telah

dinefrektomi terlihat erythropoiesisnya menurun tetapi masih dapat diukur. Disimpulkan manusia mempunyai kemampuan memelihara erythropoiesisnya walaupun dalam keadaan tanpa ginjal. Naets, 1968, memeriksa erythropoiesis pada pasien-pasien yang sedang menunggu transplantasi ginjal dan mendapatkan bahwa pada manusia tanpa ginjal penurunan erythropoiesis sumsum tulang merahnya hanya sementara saja: (21, 34).

Pada pria jumlah erythropoietin yang dikeluarkan dengan urine per 24 jam adalah $2,8 \pm 1,3$ unit sedangkan pada wanita hanya $0,9 \pm 0,4$ unit (1, 2).

Bukti-bukti yang lebih akurat tentang hubungan ginjal dengan produksi erythropoietin dilaporkan oleh Kuratowaka pada tahun 1960, 1961, dengan menggunakan ginjal kelinci terpisah (isolated rabbit kidney) dan diperfusi dengan darah yang kadar oksigennya rendah. Didapatkan kenaikan titer erythropoietin pada perfusate yang keluar. Erslev menempatkan kelinci, dalam ruangan dengan tekanan atmosfer 0,4 selama 3 jam, dan menghasilkan 40-60 unit urinary erythropoietin. Bila ginjal kelinci tersebut dipisahkan dan diperfusi dengan cairan yang sama dalam waktu yang sama, didapatkan 14 unit erythropoietin dalam perfusatnya (19, 21). Penelitian dengan metode ginjal terpisah ini masih berlanjut terus, dilakukan oleh peneliti-peneliti yang lain dan peneliti-peneliti tersebut juga mendapatkan hasil yang sama.

Kuratowska, 1963, melanjutkan penelitiannya dengan menggunakan ginjal kelinci terpisah mendapatkan adanya suatu faktor yang secara erythropoietik tidak aktif, dan apabila faktor tersebut di inkubasikan dengan larutan alpha-globulin dari plasma barulah faktor tersebut menjadi aktif (30). Bukti-bukti diatas membuktikan secara langsung ginjal sebagai penghasil " precursor " erythropoietin (erythrogenin). Peneliti-peneliti lain menggunakan cara histologis untuk menentukan lokasi pembentukan erythropoietin di dalam ginjal, apakah cortex renalis atau medulla renalis sebagai tempat pembentuknya ? Orang pertama sebagai pelaporinya adalah Oanes, yang memperkirakan juxtaglomerular cell sebagai tempat penghasil erythropoietin. Oanes mendapatkan adanya penurunan pada jumlah dan besar granula juxtaglomerular cell pada hewan yang mengalami perdarahan (21).

Sebaliknya, Kirashima dan Takaku, justru mendapatkan adanya peningkatan jumlah dan besarnya granula juxtaglomerular pada tikus-tikus yang diberi keadaan hypoxia dan adanya penurunan jumlah dan besar granula-granula juxtaglomerular pada tikus-tikus yang di hypertransfusi (27). Nakao, et al, 1967, memberikan angiotensin dengan cara intravencus drip pada kelinci dan mendapatkan adanya peningkatan produksi erythropoietin (3).

Mitus, 1968, menggunakan kelinci-kelinci yang dibuat hydronephrosis dan polycythemia dan mendapatkan penurunan

jumlah dan besar granula-granula pada juxtaglomerular -
Cell ginjal kelinci tersebut (21).

Abbrecht, 1965, mendapatkan perubahan histologis pada
cortex renalis, dan tidak ada perubahan pada medulla
renalis pada anjing yang sengaja dibuat renal infarct
(1). Busutil et al, dengan menggunakan fluorescence
anti body teknik menyimpulkan bahwa produksi erythro -
poietin adalah di sel-sel epithel glomerulus (21).

Widyanto dan Hartomo, 1972, menyuntikkan kelinci dengan
ekstrak medulla dan cortex ginjal anjing dan mendapatkan
peningkatan jumlah reticulocyte pada penyuntikan ekstrak
medulla dan tidak pada penyuntikan ekstrak cortex.

Melihat bukti-bukti diatas, kelihatannya masih banyak
pendapat yang saling bertentangan tentang cortex dan
medulla ginjal sebagai penghasil erythropoietin.

II. MASALAH

Melihat para peneliti yang masih belum sepakat tentang di bagian mana dari ginjal erythropoietin dibuat, maka penelitian ini bertujuan untuk menjawab (menjernihkan) masalah-masalah sebagai berikut :

Ekstrak yang mana dari ginjal yang mengandung erythropoietin ? (Cortex ? / medulla).

III. HIPOTESA

Dari tinjauan masalah dan kepustakaan yang tersedia maka dapat ditarik hipotesa sebagai berikut :

1. Hipotesa nul

- 1.1. Ekstrak medulla tidak merangsang erythropoiesis.
- 1.2. Ekstrak cortex tidak merangsang erythropoiesis.

2. Hipotesa alternatif

- 2.1. Ekstrak medulla merangsang erythropoiesis.
- 2.2. Ekstrak cortex merangsang erythropoiesis.

BAB II

IV. Material dan MetodeIV.1. Alat-alat yang digunakan.

IV.1.1. Gunting bengkok.

1. Beaker glass 125 cc (pyrex).
2. Corong (pyrex).
3. Jarum henke 1,70 x 35 yang dimodifikasi.
4. Jarum suntik insulin (Terumo).
5. Waterbath.
6. Saring alondor.
7. Kertas saring Whatman no. 42.
8. Mikroskop.
9. Kaca obyektif.

IV.2. Bahan-bahan

IV.2.1. Alkohol absolut.

2. Aether.
3. saline.
4. Benzidine base solution.
5. Pernyrol solution.
6. Glasa Löbong (Merek).

IV.3. Hewan percobaan

IV.3.1. Hewan percobaan.

Sebagai hewan percobaan digunakan ke-
lini jantan sebanyak 45 ekor dengan

IV.4.3. Pemisahan ginjal anjing

Sebelum diambil ginjalnya, anjing di bius dengan sodium pentobarbital.

Kemudian dilakukan laparatomi dan ginjal diambil.

Kemudian dengan gunting bengkok bagian luar yaitu cortex dipisahkan dan dikumpulkan untuk pembuatan ekstrak cortex.

Sebagian dari lapisan medulla kemudian di kupas dan dibuang sehingga tinggal bagian medulla saja yang berwarna pucat, bersih dari jaringan cortex.

Bagian pyelum dan lemak juga dipisahkan dan dibuang.

IV.4.4. Prosedur pembuatan ekstrak

40 gram jaringan ditambah 100 cc saline dimaserasi di waring blender.

Suspensi yang dihasilkan kemudian diletakkan pada suhu 37° C selama 2 jam kemudian dicentrifuge dan supernatannya diambil dan diberi alkohol sama banyak absolut.

Campuran ini kemudian difiltrasi dan filtrat diletakkan di waterbath 37° C sampai dicapai volume filtrat sebelum diberi alkohol absolut. Dan didapatkan cairan ekstrak yang jernih.

IV.4.5. Penyuntikan dilakukan setiap hari selama 6 hari dengan dosis 2 cc per hari pada vena telinga.

Sebelum dilakukan penyuntikan ekstrak, - recipient diambil darahnya secara intra cardial sebanyak 1 cc dan dilakukan bone marrow puncture pada os tibia untuk pengambilan sample sumsum tulang merah.

Sesudah penyuntikan, pada hari ketujuh pengambilan darah dan pungsi sumsum tulang merah dilakukan lagi (48).

IV.4.6. Dari jaringan pungsi sumsum tulang merah, dibuat hapusan pada kaca obyektif (smears) yang diwarnai dengan Benzidine dan Perhidrol menurut Ralph, kemudian di " counter stain " dengan Giemsa untuk melihat " nucleated red cells " yang mengandung Hemoglobin (37). Pemeriksaan sumsum tulang merah dilakukan sebelum dan sesudah penyuntikan ekstrak.

IV.4.7. Cara pengambilan jaringan sumsum tulang merah.

Kelinci dibius dengan aether. Kemudian direbahkan pada satu sisi.

Pengambilan jaringan os tibia sumsum tulang merah dilakukan pada os tibia bagian medial

sedikit dibawah patella, dengan jarum Henke yang telah dimodifikasikan.

Setelah jarum ditusukkan dan masuk menembus tulang, dipasang spuit 20 cc dan dilakukan pengisapan. Begitu cairan sumsum tulang merah kelihatan diujung spuit, pengisapan segera dihentikan dan jarum segera dicabut dan secepatnya dibuat hapusan pada kaca obyektif.

Cairan sumsum tulang merah yang dihasilkan $\pm 0,5$ cc (35, 39, 43).

IV.4.3. Darah dari jantung (intra cardial) sebanyak 1 cc diperiksa di laboratorium.

Pemeriksaan yang dilakukan adalah penghitungan sel darah merah, retikulosit, hemoglobin dan P.C.V.

IV.5. Analisa data

Data yang telah diperoleh disusun dan ditabulasikan sesuai dengan rancangan yang dipakai, kemudian dilakukan analisa statistik.

Adapun rancangan yang digunakan dalam penelitian ini adalah Uji Purna Purwa dengan kelompok kontrol acak (randomised control group pretest posttest design) (44).

Dalam hal ini sample dibagi dalam 3 kelompok, masing-masing terdiri dari 15 subyek yang diperinci

sebagai berikut :

Kelompok I : Kelompok kontrol

Kelompok II : kelompok eksperimen dengan penyuntikan ekstrak medulla ginjal.

Kelompok III : Kelompok eksperimen dengan penyuntikan ekstrak cortex ginjal.

Analisis statistik yang digunakan ialah : anakova (analisis kovarian) dengan data sebelum perlakuan sebagai prediktor dan data sesudah perlakuan sebagai kriterium.

BAB III

V. HASILNucleated Red Cells.

Peningkatan pembentukan sel darah dilihat pada pembentukan " nucleated red cells " dalam sumsum tulang merah. Pada tabel 1 terlihat peningkatan pembentukan " nucleated red cells " adalah sebagai berikut: Kelompok kontrol menunjukkan angka rata-rata sebesar $29,52 \pm 1,53$ %, pada kelompok perlakuan, penyuntikan ekstrak medulla ginjal menunjukkan angka rata-rata $48,40 \pm 2,44$ %, sedangkan pada penyuntikan ekstrak cortex ginjal menunjukkan angka rata-rata sebesar $29,83 \pm 1,88$ %.

TABEL 1. Pengaruh penyuntikan ekstrak medulla dan cortex ginjal terhadap " Nucleated Red Cell ".

	PRE %	POST %
KONTROL	$28,21 \pm 1,83$	$29,52 \pm 1,53$
Ekstrak medulla	$29,10 \pm 2,50$	$48,40 \pm 2,44$
Ekstrak cortex	$28,62 \pm 2,02$	$29,83 \pm 1,88$

Dari analisa statistik didapatkan antar perlakuan dan kontrol terdapat perbedaan yang sangat bermakna, F ratio $1921,0483$, $F_{t1\%}(2,41) = 4,61$ atau $p < 0,01$.
Lihat lampiran 1.

pada kelompok penyuntikan ekstrak cortex ginjal menunjukkan penurunan bila dibandingkan dengan kontrol, yaitu menunjukkan angka rata-rata sebesar $0,7 \pm 0,19 \%$.

TABEL 2.

Pengaruh penyuntikan ekstrak medulla dan cortex ginjal terhadap retikulosit.

	PRE	POST
KONTROL	$1,2 \pm 0,11$	$1,2 \pm 0,11$
Ekstrak medulla	$1,1 \pm 0,14$	$2,3 \pm 0,3$
Ekstrak cortex	$1,2 \pm 0,12$	$0,7 \pm 0,19$

Dari hasil analisa statistik didapatkan bahwa antar perlakuan dan kontrol terdapat perbedaan yang sangat bermakna, F ratio = $344,6535 F_{1,1\%} (2,41) = 4,61$ atau $p < 0,01$. Lihat lampiran 1.

Untuk membandingkan adanya perbedaan antar kelompok diperlukan uji t setelah analisis kovarians, (lihat lampiran 2). Dari lampiran 2 terlihat :

$$t_{1,2} = 18,46755$$

$$p < 0,01$$

Jadi antara kelompok kontrol dengan kelompok penyuntikan ekstrak medulla ginjal terdapat perbedaan yang sangat bermakna.

Untuk kelompok kontrol dengan kelompok penyuntikan ekstrak cortex ginjal terlihat :

$$t_{1,3} = 8,15818$$

$$p < 0,01$$

Jadi antara kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan penyuntikan ekstrak cortex ginjal terdapat perbedaan yang sangat bermakna tetapi menurun.

Untuk kedua kelompok perlakuan, terlihat :

$$t_{2,3} = 26,62574$$

$$p < 0,01$$

Jadi antara kedua kelompok perlakuan, penyuntikan ekstrak medulla dengan ekstrak cortex ginjal terdapat perbedaan yang sangat bermakna, akan tetapi menurun.

HEMOGLOBIN

Seperti terlihat pada tabel 3, penyuntikan ekstrak medulla ginjal menunjukkan angka rata-rata sebesar $12,02 \pm 0,58$ gram per 100 ml dibandingkan dengan kelompok kontrol yang menunjukkan angka rata-rata sebesar $10,79 \pm 0,75$ gram per 100 ml, sedangkan pada kelompok penyuntikan ekstrak cortex ginjal menunjukkan sedikit penurunan bila dibandingkan dengan kontrol, yaitu menunjukkan angka rata-rata sebesar $10,10 \pm 0,6$.

TABEL 3.

Pengaruh penyuntikan ekstrak medulla dan cortex ginjal terhadap kadar hemoglobin.

	PRE	POST
KONTROL	10,79 ± 0,74	10,79 ± 0,75
Ekstrak medulla	10,99 ± 0,63	12,02 ± 0,58
Ekstrak cortex	11,08 ± 0,57	10,10 ± 0,60

Dari hasil analisa statistik didapatkan bahwa antara perlakuan dan kontrol terdapat perbedaan yang sangat bermakna, $F_{ratio} = 93,7199$, $F_{1/2} (2,41) = 4,61$ atau $p < 0,01$.

Untuk membedakan adanya perbedaan antar kelompok, diperlukan uji t setelah analisis kovarians, seperti terlihat pada lampiran 3.

Antara kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan penyuntikan ekstrak medulla ginjal didapatkan hasil sebagai berikut :

$$t_{1,2} = 7,30775$$

$$p < 0,01$$

Jadi antara kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan penyuntikan ekstrak medulla ginjal terdapat perbedaan yang sangat bermakna.

Untuk kelompok kontrol dengan kelompok penyuntikan ekstrak cortex ginjal didapatkan hasil sebagai berikut :

$$t_{1,3} = 6,39207$$

$$p < 0,01$$

Jadi antara kelompok kontrol dengan kelompok penyuntikan ekstrak cortex ginjal terdapat perbedaan yang sangat bermakna tetapi menurun.

Untuk kelompok penyuntikan ekstrak medulla dibandingkan dengan ekstrak cortex ginjal didapatkan hasil sebagai berikut :

$$t_{2,3} = 13,69983$$

$$p < 0,01$$

Jadi, untuk kedua kelompok ini juga terdapat perbedaan yang sangat bermakna tetapi menurun.

Eritrosit

Seperti terlihat pada tabel 4 penyuntikan ekstrak medulla ginjal menunjukkan angka rata-rata sebesar $6,194133 \times 10^6 \pm 4,5286 \times 10^2$ cumm, meningkat bila dibandingkan dengan kontrol yang menunjukkan angka rata-rata sebesar $5,7914666 \times 10^6 \pm 3,5451 \times 10^2$ cumm, sedangkan penyuntikan ekstrak cortex ginjal menunjukkan angka rata-rata $5,502000 \times 10^6 \pm 2,3701 \times 10^2$ per cumm.

TABEL 4

Pengaruh penyuntikan ekstrak medulla dan cortex ginjal terhadap kadar eritrosit.

	PRE	POST
Kontrol	$5,7856666 \times 10^6 \pm 3,5288 \times 10^2$	$15,7914666 \times 10^6 \pm 35451 \times 10^2$
Ekstrak Medulla	$5,9273333 \times 10^6 \pm 38334 \times 10^2$	$16,1474666 \times 10^6 \pm 45286 \times 10^2$
Ekstrak Cortex	$5,6848666 \times 10^6 \pm 1,5680998 \times 10^2$	$15,502000 \times 10^6 \pm 2,37010 \times 10^2$

Dari hasil analisa statistik didapatkan bahwa antara perlakuan dan kontrol terdapat perbedaan yang sangat bermakna, $F_{ratio} = 25,7267$, $F_{t1\%}(2,41) = 4,61$ atau $p < 0,01$. Lihat lampiran 4.

Untuk membandingkan adanya perbedaan antar kelompok, diperlukan uji t setelah analisa kovarians seperti terlihat pada lampiran 4.

$$t_{1,2} = 2,48740$$

$$p < 0,05$$

Jadi, antara kontrol dengan perlakuan penyuntikan ekstrak medulla ginjal terdapat perbedaan yang bermakna.

$$\text{Untuk } t_{1,3} = 4,75280$$

$$p < 0,01$$

Jadi, antara kelompok kontrol dengan kelompok penyuntikan ekstrak cortex ginjal terdapat perbedaan yang sangat bermakna akan tetapi menurun.

$$\text{Untuk } t_{2,3} = 7,24021$$

$$p < 0,01$$

Jadi, antara kedua perlakuan juga terdapat perbedaan yang sangat bermakna akan tetapi menurun.

Packed Cell Volume (P.C.V.)

Seperti terlihat pada tabel 5, penyuntikan ekstrak medulla ginjal menunjukkan angka rata-rata sebesar 32,93 bila dibandingkan dengan kontrol yang menunjukkan angka rata-rata sebesar 30,67 sedangkan penyuntikan ekstrak cortex ginjal menunjukkan angka rata-rata sebesar 29,6.

TABEL 5

Pengaruh penyuntikan ekstrak medulla dan cortex ginjal terhadap (P.C.V.).

	PRE	POST
KONTROL	30,67 ± 0,78	30,67 ± 0,78
Ekstrak medulla	30,4 ± 0,8	32,93 ± 0,99
Ekstrak cortex	31,4 ± 0,61	29,6 ± 0,61

Dari hasil analisa statistik didapatkan bahwa antara perlakuan dengan kontrol terdapat perbedaan yang sangat bermakna, Fratio 221, 2572, $F_{t1\%} (2,41) = 4,61$ atau $p < 0,01$.

Untuk membedakan adanya perbedaan antar kelompok diperlukan uji t setelah analisa kovarians seperti terlihat pada lampiran 5, sebagai berikut :

$$t_{1,2} = 13,97441$$

$$p < 0,01$$

Jadi antara kelompok kontrol dengan kelompok penyuntikan ekstrak medulla ginjal terdapat perbedaan yang sangat bermakna.

$$t_{1,3} = 9,63265$$

$$p < 0,01$$

Antara kelompok kontrol dengan kelompok penyuntikan ekstrak cortex ginjal terdapat perbedaan yang bermakna akan tetapi menurun.

$$t_{2,3} = 23,60707$$

$$p < 0,01$$

Antara kedua perlakuan, penyuntikan ekstrak medulla ginjal dengan ekstrak cortex ginjal terdapat perbedaan yang sangat bermakna tetapi menurun.

BAB IV

VI. PEMBAHASAN

Beberapa peneliti telah mengadakan penelitian mengenai erythropoietin dengan menggunakan ekstrak ginjal.

Contrera, (1965) membuat ekstrak ginjal yang dihancurkan dalam pelarut hypotonic phosphate buffer.

Ginjalnya berasal dari tikus-tikus yang telah dibuat anemi dan tikus-tikus yang ditaruh dalam keadaan hypoxic.

Contrera berhasil mendapatkan sejumlah erythropoietin Stimulating Factor untuk membuktikan adanya khasiat erythropoietin dari ekstrak tersebut, dia menggunakan radio-iron polycythemic mouse assay (9).

Dan pada tahun 1966, Contrera melanjutkan penelitiannya dengan metode ekstrak yang berbeda yaitu dengan prosedur ekstraksi 2 tahap dan digunakan ginjal dari tikus-tikus yang ditaruh dalam keadaan hypoxia (0,5 atm) selama 17 jam. Juga didapatkan suatu faktor yang dapat merangsang erythropoietin bila diinkubasikan terlebih dulu dengan serum normal. Faktor ini kemudian disebut Renal Erythropoietic Factor (erythrogenin).

Dengan beberapa tehnik pemusungan (centrifuge) dapat diketahui R.E.F. tersebut berada di Light Mitochondrial Fraction dari ginjal (10).

Sherwood & Goldwasser, 1978, membuat ekstrak ginjal dari beberapa species hewan, yaitu : tikus, anjing, sapi dan kelinci.

Sebelum diambil ginjalnya hewan-hewan tersebut dibiarkan dalam keadaan normal.

Ekstrak didapat dengan menghancurkan ginjal pada temperatur 4° C dalam 0,1 M phosphate buffer, pH 7,4 dengan perbandingan 1 gram jaringan dalam 5 ml buffer.

Kemudian difiltrasi lewat 4 lapis cheesecloth filter dan 1 lapis filter nylon kemudian dipusingkan pada 16000 x g selama 30 menit pada temperature 4° C. Supernatannya di dialisis selama 6 jam terhadap deionized water yang dingin dan kemudian di lyophilisasikan.

Efek erythropoiesisnya di uji dengan :

- ion exchange chromatography
- secara in vitro dengan : bone marrow & fasted-rat method
- secara in vivo dengan : tikus yang telah dibuat polycythemic

Didapatkan hasil sebagai berikut :

0,26 U/g ginjal domba
0,41 U/g ginjal anjing
0,11 U/g ginjal tikus

Hasil ini didapat dari fasted-rat method.

Dari bone marrow culture, didapatkan hasil sebagai berikut :

0,35 U/g ginjal anjing
2,12 U/g ginjal kelinci (40).

Pada penelitian kami dengan menggunakan resipien kelinci dan donor ginjal anjing normal dan dipakai 5 kriteria sebagai evaluasi, nucleated red cells, retikulosit,

packed cell volume, terlihat bahwa penyuntikan ekstrak medulla ginjal meningkatkan jumlah nucleated red cells, retikulosit, eritrosit, hemoglobin dan packed cell volume dibandingkan dengan kontrol sedangkan penyuntikan ekstrak cortex ginjal menurunkan jumlah retikulosit, eritrosit, hemoglobin, dan packed cell volume bila dibandingkan dengan kontrol.

Dari hasil perhitungan statistik terlihat adanya perbedaan yang bermakna.

Pada " nucleated red cell " terdapat perbedaan yang sangat bermakna, $p < 0,01$

Pada hemoglobin terdapat perbedaan yang sangat bermakna, $p < 0,01$

Pada retikulosit terdapat perbedaan yang sangat bermakna, $p < 0,01$

Pada eritrosit terdapat perbedaan yang sangat bermakna, $p < 0,01$

Pada packed cell volume terdapat perbedaan yang sangat bermakna, $p < 0,01$

Pada penyuntikan ekstrak medulla terlihat peningkatan jumlah " nucleated red cells " yang mengandung hemoglobin. Bahwa disini betul-betul terjadi peningkatan erythropoiesis terlihat dari meningkatnya jumlah " nucleated red cells " yang mengandung hemoglobin dalam sumsum tulang merah di sertai peningkatan pada jumlah retikulosit.

Peningkatan hemoglobin, eritrosit dan P.C.V. menunjukkan adanya peningkatan erythropoiesis dan bukan hanya sekedar mobilisasi depot-depot eritrosit seperti limpa yang memang dapat berkontraksi oleh zat-zat yang aktif seperti yang disimpulkan oleh Hartomo & Widyanto, 1972,

Pada penyuntikan ekstrak cortex tidak terlihat peningkatan " nucleated red cells " yang mengandung hemoglobin dan di sertai penurunan pada jumlah hemoglobin, eritrosit dan P.C.V. Penurunan ini bukan disebabkan oleh hambatan erythropoiesis sebab " nucleated red cells " tidak ikut menurun. Penyebabnya mungkin suatu faktor yang dapat menyimpan darah kedalam depot-depot, seperti yang ditulis oleh Hartomo & Widyanto, 1972 yang menyebut faktor tersebut " Blood Conserving Factor ".

Dari hal-hal tersebut diatas dapat ditarik kesimpulan ekstrak medulla ginjal mengandung erythropoietin dan ekstrak cortex ginjal mengandung suatu faktor yaitu " Blood Conserving Factor ".

BAB V

VII. KESIMPULAN

Dalam penelitian ini ditunjukkan bahwa pemberian ekstrak medulla ginjal dapat meningkatkan erythropoiesis di sumsum tulang merah. Dengan pemberian ekstrak medulla ginjal terjadi peningkatan yang bermakna dalam hal erythropoiesis. Pada kelompok perlakuan yang diberi ekstrak medulla ginjal dibandingkan dengan kelompok kontrol dan kelompok perlakuan yang diberi ekstrak cortex ginjal menunjukkan peningkatan erythropoiesis yang sangat bermakna.

Kemungkinan mekanisme yang menyebabkan hal ini adalah sebagai berikut :

ekstrak medulla ginjal mengandung erythropoietin sedangkan ekstrak cortex ginjal tidak mengandung erythropoietin sehingga pemberian ekstrak medulla ginjal merangsang erythropoiesis baik di sumsum tulang merah. Sebagai kesimpulannya, ekstrak medulla ginjal merangsang erythropoiesis di sumsum tulang merah.

Masih diperlukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui sel medulla ginjal yang mana yang menghasilkan erythropoietin.

BAB VI

VIII. RINGKASANPENGARUH INYUNTIKAN EKSTRAK MEDULLA GINJAL
PADA BONE MARROW

Pada penelitian ini digunakan 45 ekor kelinci sebagai recipient yang dibagi dalam 3 kelompok, yaitu :

Kelompok kontrol 15 ekor

Kelompok perlakuan yang diberi ekstrak medulla ginjal 15 ekor.

Kelompok perlakuan yang diberi ekstrak cortex ginjal 15 ekor.

Sebagai donor ginjal digunakan ginjal anjing.

Pemberian ekstrak dilakukan secara intravena pada vena telinga. Sebelum dan sesudah pemberian, semua kelinci diambil susunan tulangnya dan darah periferanya, untuk dihitung jumlah nucleated red cell, retikulosit, hemoglobin, eritrosit dan packed cell volume nya.

Sebagai hasil didapatkan :

Kelompok kontrol :

nucleated red cell	\bar{x} :	$29,52 \pm 1,53$
retikulosit	\bar{x} :	$1,2 \pm 0,11$
hemoglobin	\bar{x} :	$10,79 \pm 0,75$
eritrosit	\bar{x} :	$5791466,6 \pm 35451$
p.c.v.	\bar{x} :	$30,67 \pm 0,78$

kelompok penyuntikan ekstrak medulla ginjal :

nucleated red cell \bar{x}	:	48,40 \pm 2,44
retikulosit \bar{x}	:	2,3 \pm 0,3
hemoglobin \bar{x}	:	12,02 \pm 0,58
eritrosit \bar{x}	:	6194133 \pm 45286
p.c.v. \bar{x}	:	32,93 \pm 0,99

kelompok penyuntikan ekstrak cortex ginjal :

nucleated red cell \bar{x}	:	29,83 \pm 1,88
retikulosit \bar{x}	:	0,7 \pm 0,19
hemoglobin \bar{x}	:	10,10 \pm 0,60
eritrosit \bar{x}	:	5502000 \pm 23701
p.c.v. \bar{x}	:	29,6 \pm 0,61

Secara statistik didapatkan perbedaan yang bermakna diantara kelompok kontrol dengan kedua kelompok (p 0,01).

Disimpulkan ekstrak medulla ginjal merangsang ery - thropoiesis di bone marrow dan di darah perifer.

BAB VII

IX. DAFTAR PUSTAKA

1. Abbrecht, P.H. ; & Malvin, R.L. : Renal Production of Erythropoietin in the dog. *Am. J. Physiol.* 210 : 237 - 242, 1966.
2. Adamson, J.W. ; Alexanian, R. ; Martinez, C. & Finch, C.H. : Erythropoietin excretion in normal men. *Blood* 28 : 3, 1966.
3. Alexanian, R. ; Urinary excretion of erythropoietin in normal men and women. *Blood* 28 : 3, 1966
4. Anagnostou, A. ; Baranowski, R. ; Pillay, V.K.G. ; Kurtzmann, N. ; Vercelletti, C. & Fried, W. : Effect of Renin on extrarenal erythropoietin production. *J. Lab. Clin. Med.* 88 : 5, 1976.
5. Bersock, H. ; Graybiel, A. ; Keighly, G. & Windsor, P. ; Polycythemic response in normal adult rats to a non-protein extract from anemic rabbits. *Blood* 9 : 734, 1954.
6. Brown, B.A. 1976. *Hematology : Principles and Procedures*. 2^{ED}. Lea & Febiger. Philadelphia.
7. Campbell, J.H. ; Pasquier, G.M. ; Bugans, C. ; Martin, S.T. & Worley, P.C. : Hypernephroma Associated with polycythemia and eosinophilic dermatitis. *J. Urol.* 79 : 12, 1958.
8. Coles, P.H. 1974. *Veterinary Clinical Pathology*. 2^{ED}. W.P. Saunders Company, Philadelphia, London, Toronto.

9. Contrera, J.P. ; Camiscoli, J.P. ; Weintraub, A.H. & Gordon, A.S. : Extraction of erythro - poietin from kidneys of Hypoxic & pheny- lhydrazine - treated rats. Blood 25 : 809, 1965.
10. Contrera, J.P. ; Gordon, A.S. & Weintraub, A.H. : Extracti on of an erythropoietin - pro- ducing factor from a particulate fraction of rat kidney. Blood 28 : 3, 1966.
11. Crossby, W.H. & Furth, F.W. : A Modification of the banzi dine method for measurement of he - moglobin in plasma and liver. Blood 11 : 4, 1955.
12. Erslev, A.J. : Humoral Regulation of red cells production. Blood 8 : 349, 1953.
13. Erslev, A.J. : Observation on the nature of the erythropoietin serum factor. Blood 10 : 9, 1955.
14. Erslev, A.J. : Physiologic control of red cell production. Blood 9 : 11, 1954.
15. Erslev, A.J. : Erythropoietic function in dilution anemia. Blood 6 : 616, 1955.
16. Erslev, A.J. : Observation on the nature of the erythropoietic serum factor II. Erythro- poietic activity of serum and bone marrow after time limited exposure to anemic and hypoxic anoxia. J. Lab. & Clin. Med. 50 : 4, 1957.

17. Erslev, A.J. & Kasal, L.A. : Renal erythropoietic factor Lack of effect on hypertransfused mice. Blood 34 : 2, 1969.
18. Erslev, A.J. : In vitro production of erythropoietin by kidneys perfused with a serum - free solution. Blood 44 : 1, 1974.
19. Forth, W. and Rummel, W. : Iron absorption. Physiological Review 23 : 2, 1973.
20. Fischer, J.W. 1977. Kidney Hormones. Vol II. Erythropoietin. Academic Press. London - New York - San Francisco.
21. Goldwasser, E. ; Eliason, J.F. & Siklema, D. : An Assay for erythropoietin in vitro at the milliunit level Endo. 97 : 2, 1975.
22. Greenberg., P. & Golde, D.W. : Erythropoiesis in familial erythrocytosis. N.E.J.M. 296 : 19, 1977.
23. Guyton, A.C. 1976. Textbook on medical physiology. 5th Ed. W.B. Saunders company. Philadelphia London Toronto.
24. Harigaya, K. ; Cronkite, E.D. ; Miller, W.B. & Moccia, G. : Further evidence of the in vivo role of Erythropoietin or companion molecules induced by hypoxia on proliferation and continuing differentiation of BPU - e in PCDC. Blood 57 : 2, 1981.

25. Hodgson, G. & Toha, J. : The Erythropoietic of urine and plasma of repeatedly bled rabbits. *Blood* 9 : 4, 1954.
26. Hirashima, K. and Takaku, F. : Experimental studies on erythropoietin II. The Relationship between juxta glomerular cells and erythropoietin. *Blood* 20 : 1, 1962.
27. Klerk, G. : Rosengarten, P.C.J. & Gondsmit, F. : Serum erythropoietin (E.S.P.) Titers in Anemia. *Blood* 56 : 6, 1981.
28. Klerk, G. : Rosengarten, P.C.J. & Goudsmith, R. : Serum erythropoietin (E.S.P.) Titers in Polycythemia. *Blood* 58 : 6, 1981.
29. Krantz, S.B. : Recent contribution to the mechanism of action and clinical relevance of erythropoietin. *J. Lab. Clin. Med.* 82 : 6, 1973.
30. Kuratowska, Z. : Lewartowski, B. & Lepinski, B. : Chemical and biologic properties of an erythropoietin generating substances obtained from perfusates of isolated anoxic kidneys. *J. Lab. & Clin. Med.* 64 : 2, 1963.
31. Niale, J.P. 1958. *Laboratory Medicine-Hematology.* The C.V. Mosby company. St. Louis.
32. Naets, J.P. : The Role of the kidney in erythropoiesis. *J. Clin. Invest.* 39 : 102, 1960.

33. Naets, J.P. & Wittek, M. : Erythropoiesis in anephric man. *The Lancet* 1 : 4, 1968.
34. Nakao, K. : Shirakura, T. : Azuma, M. & Maekawa, T. : Studies on erythropoietic action of angiotensin II. *Blood* 29 : 5, 1967.
35. Osborne, G.A. : Symposium on Biopsy Technique. *The Veterinary Clinics of North America* 4 : 2, 1974.
36. Friessnitz, J.W. : Schooley, J.C. & Mahlmann, L.J. : Inhibition of erythropoietin production in unanaesthetized rabbits exposed to an acute Hypoxic-Hypercapnic Environment. *Blood* 52 : 1, 1978.
37. Ralph, P.H. : The Histochemical demonstration of Hemoglobin in Blood Cells and Tissue Smears. *Stain Technology* 16 : 3, 1941.
38. Reismann, K.R. : Nomura, T. : Gunn, R.W. & Brosius, F. : Erythropoietic Response to Anemia or Erythropoietin Injection in Uremic Rats With or without Functioning Renal Tissue. *Blood* 16 : 11, 1960.
39. Schalm, C.W. : Jain, K.C. : Carroll, E.J. 1975. *Veterinary Hematology*, 3rd Ed. Philadelphia.
40. Sherwood, J.P. & Goldwasser, P. : Extraction of erythropoietin from normal kidneys. *Endo.* 103 : 3, 1978.

41. Stohlman, F. ; Brecher, G. & Bethesda : Humoral of Regulation of erythropoiesis III. Effect of exposure to stimulated altitude. J. Lab. Clin Med. 49 : 6, 1957.
42. Stohlman, F. ; Charles, E. & Rose, J.C. : Evidence for a humoral regulation of erythropoiesis. Studies in a patient with polycythemia secondary to regional hypoxia. Blood 9 : 721, 1954.
43. Sundberg, R.D. & Hodgson, R.E. : Aspiration of Bone Marrow in Laboratory Animals. Blood 4 : 557, 1949.
44. Suryabrata, S. 1983. Metodology Penelitian. Paket Program Akta Mengajar V. C.V. Rajawali.
45. Soetrisno Hadi. 1976. Rasi Experimental. Naskah khusus dalam rangka Penataran Metodologi Penelitian dan Dasar-dasar Statistik ke VI di Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga.
46. Toyama, K. et al : Erythropoietin level in the Course of a Patient with Erythropoietin-Producing Renal cell Carcinoma and Transplantation of this Tumor in Nude Mice. Blood 54 : 1, 1979.
47. Travnicek, T. & Keuwirt, J. 1971. The regulation of Erythropoiesis and Haemoglobin Synthesis. Universitas Karlova, Praha.

48. Widyanto, I. & Hartomo, P. : Some Hematological studies on the Influence of Intravenous Injections of Renal Extracts in Rabbits. A Preliminary Report. The Third Seminar of the Indonesian Physiological Society 1972. Denpasar. Bali.
49. Zucker, S. : Iysik, R.M. & Mohamad, G. : Erythropoiesis in Chronic Renal Disease. J. Lab. Clin. Med. 88 : 4, 1976.

LAMPIRAN : I

RANGKUMAN ANAVA FAKTOR X (KOVARIABEL)
 RANCANGAN RANDEKANG LUGAS
 PEUBAH : NUCLEATED RED CELLS

DER. BEBAS	JUMLAH KWADRAT	HIPURA KWADRAT	F ratio	p
2	6.18743	3.093716	0.64282	0.53549811
42	202.13463	4.812729		
44	208.32206			

RANGKUMAN ANAVA FAKTOR Y (KRITERIUM)
 RANCANGAN RANDEKANG LUGAS

PADA PENELITIAN : PENGARUH EKSTRAK MEDULLA GINJAL PADA GAMBARAN BONE MARROW
 PEUBAH : NUCLEATED RED CELLS

DER. BEBAS	JUMLAH KWADRAT	HIPURA KWADRAT	F ratio	p
2	3504.60867	1752.304336	413.69999	0.00000000
42	177.89892	4.235689		
44	3682.50759			

diproses oleh SATGAS KOMPUTER FK. UNAIR.

RANGKUMAN ANAKOVA RANCANGAN RANGBANG LUGAS

TEMA PENELITIAN : PENGARUH EKSTRAK MEDULLA GINJAL PALM SAMBAPAN BONE MARECA
 PEUPA H : NUCLEATED RED CELLS

DER. BEBAS	JUMLAH KWADRAT	HIPURA KWADRAT	F ratio	P
2	3269.57475	1634.787376	1921.0485	0.00000000
41	34.89047	0.850987		
43	3304.46522			

MATRIX HASIL UJI t ANTAR KELOMPOK

SETELAH ANALISIS KOVARIAN SATU PREDIKTOR RANCANGAN RANGBANG LUGAS

t	1 2	=	55.814215111
p		=	0.000000000024
t	1 3	=	0.599262021
p		=	0.559157832808
t	2 3	=	54.413477131
p		=	0.000000000024

diproses oleh SATGAS KOMPUTER PELUKAIR

LAMPIRAN : II

RANGKUMAN ANAVA FAKTOR X (KOVARIABEL)
 RANCANGAN RAMEBANG LUGAS
 PEUBAH : RETICULOOCYTE

NUMER VARIASI	DER. BEBAS	JUMLAH KWADRAT	HIPURA KWADRAT	F ratio	P
ANTAR KELOMPOK	2	0.06178	0.030889	1.62924	0.19535136
ERROR DALAM	42	0.76800	0.018286		
TOTAL	44	0.82978			

RANGKUMAN ANAVA FAKTOR Y (KRITERIUM)
 RANCANGAN RAMEBANG LUGAS
 PADA PENELITIAN : PENGARUH EKSTRAK MEDULA GINJAL PADA GAMBARAN BONE MARROW
 PEUBAH : RETICULOOCYTE

NUMER VARIASI	DER. BEBAS	JUMLAH KWADRAT	HIPURA KWADRAT	F ratio	P
ANTAR KELOMPOK	2	19.78133	9.890667	195.51504	0.00000000
ERROR DALAM	42	2.14667	0.051111		
TOTAL	44	21.92800			

diproses oleh SANGAL KOMPUTER EL UNIK

RANGKUMAN ANALISA RANCANGAN RANGBANG LUGAS

RESEARCH : PENGARUH EKSTRAK MEDULLA GINJAL PADA GAMBARAN BONE MARROW
 PEUBAH : RETICULOCYTE

ER ASI	DER. BEBAS	JUMLAH KWADRAT	HIPURA KWADRAT	F ratio	p
R OMPOK	2	20.61966	10.309828	344.6535	0.00000000
R AM	41	1.22646	0.029914		
L	43	21.84611			

MATRIX HASIL UJI t ANTAR KELOMPOK

SETELAH ANALISIS KOVARIAN SATU PREDIKTOR RANCANGAN RANGBANG LUGAS
 PEUBAH : RETICULOCYTE

t	1 2	=	18.467557912
P		=	0.000000001672
t	1 3	=	2.158189267
P		=	0.000000736962
t	2 3	=	26.625747179
P		=	0.000000000252

diproses oleh SATGAS KOMPUTER FK. UNAIR

LAMPIRAN : III

RANGKUMAN ANAVA FAKTOR X (KOVARIABEL)
 RANCANGAN RAMBANG LUGAS
 PEUBAH : HEMOGLOBIN

SUMBER VARIASI	DER. BEBAS	JUMLAH KWADRAT	NIPURA KWADRAT	F ratio	p
ANTAR KELOMPOK	2	0.68279	0.341396	0.74357	0.51426223
ERROR DALAM	42	19.28351	0.459131		
TOTAL	44	19.96630			

RANGKUMAN ANAVA FAKTOR Y (KRITERIUM)
 RANCANGAN RAMBANG LUGAS
 PADA PENELITIAN : PENGARUH EKSTRAK MEDULLA GINJAL PADA GAMBARAN BONE MARROW
 PEUBAH : HEMOGLOBIN

SUMBER VARIASI	DER. BEBAS	JUMLAH KWADRAT	NIPURA KWADRAT	F ratio	p
ANTAR KELOMPOK	2	28.17457	14.087287	30.66850	0.00000160
ERROR DALAM	42	19.29231	0.459341		
TOTAL	44	47.46688			

RANGKUMAN ANALISA RANCANGAN RAMPANG LUGAS
 ADA PENELITIAN : PENGARUH EKSTRAK MEDULLA GINJAL PADA GAMBARAN BONE MARROW
 PEUBAH : HEMOGLOBIN

SUMBER VARIASI	DER. BEBAS	JUMLAH KWADRAT	NIPURA KWADRAT	F ratio	p
ANTAR KELOMPOK	2	29.73924	14.869620	93.7199	0.00000001
ERROR DALAM	41	6.50507	0.158660		
TOTAL	43	36.24431			

MATRIX HASIL UJI t ANTAR KELOMPOK

SETELAH ANALISIS KOVARIAN SATU PREDIKTOR RANCANGAN RAMPANG LUGAS
 PEUBAH : HEMOGLOBIN

t	1 2	=	7.307758418
p		=	0.000001969921
t	1 3	=	6.392076207
p		=	0.000006704124
t	2 3	=	13.699854624
p		=	0.000000011610

diproses oleh SATGAS KOMPUTER FK. UNAIR

LAMPIRAN : IV

RANGKUMAN ANAVA FAKTOR X (KOVARIABEL)
 RANCANGAN RAMBANG LUGAS
 PEUBAH : ERITROSIT

SUMBER VARIASI	DER. BEBAS	JUMLAH KWADRAT	NIPURA KWADRAT	F ratio	P
ANTAR KELOMPOK	2	0.73579	0.367897	2.39584	0.10160925
ERROR DALAM	42	6.44937	0.153557		
TOTAL	44	7.18517			

RANGKUMAN ANAVA FAKTOR Y (KRITERIUM)
 RANCANGAN RAMBANG LUGAS
 PADA PENELITIAN : PENGARUH EKSTRAK MEDULLA GINJAL PADA GAMBARAN BONE MARROW
 PEUBAH : ERITROSIT

SUMBER VARIASI	DER. BEBAS	JUMLAH KWADRAT	NIPURA KWADRAT	F ratio	P
ANTAR KELOMPOK	2	3.19858	1.599292	10.62195	0.00056764
ERROR DALAM	42	6.32372	0.150565		
TOTAL	44	9.52231			

diproses oleh SATGAS KOMPUTER FE. UNAIR.

RANGKUMAN ANAKOVA RANCANGAN RAMBANG LUGAS
 DA PENELITIAN : PENGARUH EKSTRAK MEDULLA GINJAL PADA GAMBARAN BONE MARROW
 PEUBAH : ERITROSIT

NUMBER VARIASI	DER. BEBAS	JUMLAH KWADRAT	NIPURA KWADRAT	F ratio	p
ANTAR KELOMPOK	2	4.34411	2.172055	25.7267	0.00000401
ERROR DALAM	41	3.46155	0.084428		
TOTAL	43	7.80566			

MATRIX HASIL UJI t ANTAR KELOMPOK

SETELAH ANALISIS KOVARIAN SATU PREDIKTOR RANCANGAN RAMBANG LUGAS
 PEUBAH : ERITROSIT

t	1 2	=	2.487407737
p		=	0.016181544766
t	1 3	=	4.752802695
p		=	0.000103840282
t	2 3	=	7.240210452
p		=	0.000002142682

diproses oleh «SITGAS KOMPUTER FE. UNAIR»

ASPIRASI V

RANGKUMAN ANAVA FAKTOR X (KOVARIABEL)
 RANCANGAN RAMEBANG LUGAS
 PEUBAH : PACKED CELL VOLUME

SUMBER VARIASI	DER. BEBAS	JUMLAH KWADRAT	HIPURA KWADRAT	F ratio	p
ANTAR KELOMPOK	2	8.04444	4.022222	6.88587	0.00293612
ERROR DALAM	42	24.53333	0.584127		
TOTAL	44	32.57778			

RANGKUMAN ANAVA FAKTOR Y (KRITERIUM)
 RANCANGAN RAMEBANG LUGAS

DATA PENELITIAN : PENGARUH EKSTRAK MEDULLA GINJAL PADA GAMBARAN BONE MARROW
 PEUBAH : PACKED CELL VOLUME

SUMBER VARIASI	DER. BEBAS	JUMLAH KWADRAT	HIPURA KWADRAT	F ratio	p
ANTAR KELOMPOK	2	86.93333	43.466667	61.12500	0.00000007
ERROR DALAM	42	29.86667	0.711111		
TOTAL	44	116.80000			

diproses oleh SATGAS KOMPUTER FK. UNAIR.

RANGKUMAN ANAKOVA RANCANGAN RAMBANG LUGAS
 PADA PENELITIAN : PENGARUH EKSTRAK MEDULLA GINJAL PADA GAMBARAN BONE MARROW
 PEUBAH : PACKED CELL VOLUME

SUMBER VARIASI	DER. BEBAS	JUMLAH KWADRAT	NIPURA KWADRAT	F ratio	P
ANTAR KELOMPOK	2	106.83542	53.417710	221.2572	0.00000000
ERROR DALAM	41	9.89855	0.241428		
TOTAL	43	116.73397			

MATRIX HASIL UJI t ANTAR KELOMPOK

SETELAH ANALISIS KOVARIAN SATU PREDIKTOR RANCANGAN RAMBANG LUGAS
 PEUBAH : PACKED CELL VOLUME

t	1 2	=	13.974419172
P		=	0.000000010096
t	1 3	=	9.632655990
P		=	0.000000177029
t	2 3	=	23.607075161
P		=	0.000000000444

diproses oleh SATGAS KOMPUTER FK. UNAIR

LAPTEPAK

TABLE. HAUSA NUCLEATED FEED GRILL.

KATROLI	KATROLI		MEDIA		COXTEX	
	PRE	POST	PRE	POST	PRE	POST
1	28,57	29,64	33,53	52,41	26,52	27,98
2	28,91	30,00	28,57	50,39	28,57	28,83
3	25,19	28,70	33,19	51,87	28,16	29,92
4	30,14	30,16	25,19	46,01	30,0	32,1
5	30,13	30,30	25,59	45,0	29,41	30,04
6	27,56	30,21	30,04	49,0	31,44	31,89
7	26,42	29,64	30,11	49,04	31,17	32,43
8	26,42	27,16	30,64	49,19	32,87	33,21
9	32,21	33,2	28,67	48,21	26,32	26,33
10	29,65	31,05	28,75	48,44	28,25	30,12
11	28,41	29,65	27,96	46,31	26,8	28,41
12	29,41	30,64	28,49	47,09	27,53	28,86
13	26,32	28,44	25,33	44,07	25,15	27,53
14	27,02	27,31	32,0	51,87	28,50	29,41
15	26,81	29,04	28,47	47,11	28,67	30,5

$\bar{x} : 29,22$ $\bar{x} : 442,9$ $\bar{x} : 436,54$ $\bar{x} : 726,01$ $\bar{x} : 429,36$ $\bar{x} : 447,56$
 $\bar{x} : 29,22$ $\bar{x} : 29,52$ $\bar{x} : 29,10$ $\bar{x} : 40,40$ $\bar{x} : 28,62$ $\bar{x} : 29,83$

$sd : 1,07$ $sd : 1,53$ $sd : 2,15$ $sd : 2,44$ $sd : 2,02$ $sd : 1,88$

LAMPIRAN III

TABEL HARGA PERTICULOSIT

No.	KONTROL		MEDULA		CORTEX	
	PRE	POST	PRE	POST	PRE	POST
1	1,1	1,1	0,9	2,0	1,1	0,6
2	1,1	1,1	0,9	1,4	1,4	1,1
3	1,2	1,2	1,2	2,6	1,4	1,1
4	1,2	1,2	1,1	2,2	1,3	0,9
5	1,1	1,1	1,2	2,6	1,4	0,7
6	1,3	1,3	1,2	2,5	1,1	0,6
7	1,3	1,3	1,1	2,2	1,1	0,5
8	0,9	0,9	1,0	2,2	1,2	0,7
9	1,3	1,3	1,3	2,5	1,2	0,7
10	1,1	1,1	0,9	2,0	1,0	0,5
11	1,1	1,1	0,9	2,1	1,1	0,6
12	1,4	1,4	1,3	2,4	1,1	0,5
13	1,2	1,2	1,3	2,4	1,2	0,6
14	1,2	1,2	1,2	2,5	1,2	0,6
15	1,1	1,1	1,1	2,2	1,1	0,5
	\bar{x} : 1,2	\bar{x} : 1,2	\bar{x} : 1,1	\bar{x} : 2,4	\bar{x} : 1,2	\bar{x} : 0,7
	sd : 0,11	sd : 0,11	sd : 0,14	sd : 0,3	sd : 0,12	sd : 0,19
	17,6	17,6	16,6	36	17,9	10,2

LAMPIRA N VIII.

TABEL HASIL PEMERIKSAAN.

KOMPUL				MEDULLA				CORTEX						
No.	PRF	POST	No.	PRF	POST	No.	PRF	POST	No.	PRF	POST			
1	10,85	10,85	1	10,08	11,22	1	10,22	9,75	1	10,22	9,75			
2	9,86	9,84	2	10,59	11,74	2	11,68	10,36	2	11,68	10,36			
3	10,66	10,66	3	10,78	11,80	3	11,00	10,86	3	11,00	10,86			
4	11,91	11,91	4	10,81	11,44	4	11,49	10,30	4	11,49	10,30			
5	9,99	9,99	5	11,58	12,86	5	10,22	10,14	5	10,22	10,14			
6	10,98	10,99	6	11,91	12,62	6	11,68	10,91	6	11,68	10,91			
7	11,91	11,53	7	11,85	12,41	7	11,61	10,91	7	11,61	10,91			
8	10,74	10,71	8	10,65	11,36	8	11,43	10,35	8	11,43	10,35			
9	9,41	9,41	9	11,95	12,86	9	10,99	99,35	9	10,99	99,35			
10	10,17	10,15	10	10,41	11,14	10	10,74	9,56	10	10,74	9,56			
11	10,21	10,21	11	10,31	11,99	11	10,86	9,59	11	10,86	9,59			
12	11,45	11,49	12	10,60	11,98	12	11,91	9,52	12	11,91	9,52			
13	10,75	10,75	13	11,84	12,39	13	10,36	9,04	13	10,36	9,04			
14	12,10	12,15	14	10,41	11,61	14	11,65	10,95	14	11,65	10,95			
15	11,25	11,25	15	11,07	12,83	15	10,44	9,96	15	10,44	9,96			
Σ : 161,84			Σ : 161,88			Σ : 164,82			Σ : 166,28			Σ : 151,55		
sd : 0,74			sd : 0,75			sd : 0,63			sd : 0,58			sd : 0,60		

LAJUTIRAN 43

TABEL HAIK ERYTHROCYT.

KOTRBD		MEDULA		CORTEX	
No.	PRE	POST	No.	PRE	POST
1	5420000	5830000	1	5550000	5900000
2	5420000	5420000	2	5600000	5980000
3	5800000	5095000	3	5640000	5980000
4	6120000	6120000	4	5800000	5920000
5	5460000	5450000	5	6210000	6832000
6	5250000	5250000	6	6270000	6800000
7	6170000	6170000	7	6270000	6710000
8	5840000	5841000	8	5700000	5840000
9	5720000	5720000	9	6700000	6750000
10	5110000	5110000	10	5650000	5800000
11	5740000	5740000	11	5600000	5700000
12	6025000	6025000	12	5610000	5700000
13	5800000	5800000	13	6660000	6900000
14	6500000	6500000	14	5635000	5700000
15	6000000	6000000	15	5905000	6500000
Σ: 5707666,61		Σ: 5791466,61	Σ: 5927333,3		Σ: 6147466,61
Ind: 352000		Ind: 354510	Ind: 303348		Ind: 452860
Σ: 86780000		Σ: 86872000	Σ: 88900000		Σ: 92912000
Σ: 82530000		Σ: 82530000	Σ: 85273000		Σ: 82530000
Σ: 5502000		Σ: 5502000	Σ: 5684866,6		Σ: 5502000
Ind: 237010		Ind: 237010	Ind: 156809,81		Ind: 237010

IA MPYRAN X.

TA BEL. HARGA P.C.V.

KORPPOJ.		MEDULA		CORTEX					
No.	PRE	POST	No.	PRE	POST	No.	PRE	POST	
1	32	32	1	29	31	1	32	30	
2	31	31	2	29	31	2	31	29	
3	31	31	3	30	34	3	31	29	
4	31	31	4	32	34	4	32	30	
5	32	32	5	31	33	5	32	30	
6	30	30	6	30	33	6	32	30	
7	31	31	7	30	32	7	31	29	
8	30	30	8	31	35	8	32	31	
9	30	30	9	30	32	9	32	30	
10	31	31	10	31	34	10	31	29	
11	31	31	11	31	33	11	31	29	
12	31	31	12	30	34	12	30	29	
13	30	30	13	30	33	13	31	30	
14	30	30	14	31	33	14	32	30	
15	29	29	15	31	34	15	31	29	
Σ : 460		Σ : 460		Σ : 494		Σ : 471		Σ : 444	
x̄ : 30,67		x̄ : 30,67		x̄ : 32,93		x̄ : 31,4		x̄ : 29,6	
sd : 0,78		sd : 0,78		sd : 0,99		sd : 0,61		sd : 0,61	

LA MPIRAN K.

TA BEL HARGA P.C.V.

No.	KONTROL		MEDULA		CORTEX	
	PRE	POST	PRE	POST	PRE	POST
1	32	32	29	31	32	30
2	31	31	29	31	31	29
3	31	31	30	34	31	29
4	31	31	32	34	32	30
5	32	32	31	33	32	30
6	30	30	30	33	32	30
7	31	31	30	32	31	29
8	30	30	31	32	32	31
9	30	30	30	32	32	30
10	31	31	31	34	31	29
11	31	31	31	33	31	29
12	31	31	30	34	30	29
13	30	30	30	33	31	30
14	30	30	31	33	32	30
15	29	29	31	34	31	29
	\bar{x} : 30,67	\bar{x} : 30,67	\bar{x} : 30,4	\bar{x} : 32,93	\bar{x} : 31,4	\bar{x} : 29,6
	sd : 0,78	sd : 0,78	sd : 0,8	sd : 0,99	sd : 0,61	sd : 0,61