

DETEKSI DINI PENYAKIT TUMOR SEL DARAH MYELOSIT LEUKOSIS MELALUI PEMERIKSAAN ULAS DARAH

Dewi Ratih Agungpriyono¹⁾, Hernomoadi Huminto¹⁾, Sri Estuningsih¹⁾,
Aryani Sismin Satyaningtjas²⁾

ABSTRACT

EARLY DETECTION OF MYELOCYTES BLOOD CELL TUMOR OF AVIAN LEUKOSIS FROM BLOOD SMEAR EXAMINATION

Myelocytes blood cell tumor in chicken is a disease caused by retrovirus, avian leukosis virus subgroup J (ALV-J). The virus has the same group as human retrovirus (HIV) which caused AIDS, but the avian type possesses oncogenic properties, that could induce cell transformation and tumor formation. ALV-J stimulates the bone marrow's myelocytes and transforms them into tumor cell myelocytoma. The tumor cells then metastasis through the circulatory system causing myeloid leukosis and tumor cells accumulation in various internal organs or myelocytomatosis. This study was done on the base of the leukosis behavior of the tumor. The finding of the metastasis tumor cell in the blood smear examination is thought could be use as the diagnostic clue of the disease. Blood smear from sick chickens are collected and stained with some chemical staining substance such as may grunwald-giemsa, hematoxyllin eosin, periodic acid Schiff, congo red, toluidine blue, and sudan black B. Cytochemistry character of the blood cells was observed using light microscope. The result showed that myelocytes granules were best observed using hematoxyllin eosin, periodic acid Schiff, congo red and toluidine blue while may grunwald-giemsa, and sudan black B could not differentiate the granules. By this method, the field veterinarian will able to screen the suspected chicken flock for myeloid leukosis earlier than the occurrence of tumor formation.

Keywords : avian leukosis; blood smear; myeloid leukosis; myelocytomatosis; avian blood cell tumor

ABSTRAK

Penyakit tumor sel darah myelosit (myeloid leukosis, ML) pada unggas disebabkan oleh virus golongan retrovirus avian leukosis virus subgroup J (ALV-J). Virus dengan golongan yang sama dengan virus penyebab HIV/AIDS pada manusia. ALV-J pada unggas mempunyai sifat onkogenik, yaitu mampu melakukan transformasi dan pembentukan sel tumor. ALV-J terutama menyerang sel-sel darah putih tipe myelosit di sumsum tulang dan menyebabkan tranformasi sel tumor myelosit atau myelositoma. Tumor ini kemudian bermetastasis melalui sistem peredaran darah menyebabkan kondisi yang disebut myeloid leukosis dan akumulasi tumor myelositomatosi di pelbagai organ interna.

Sifat leukosis dari tumor sel myelosit yang beredar di dalam sistem peredaran darah dijadikan dasar pemikiran penelitian ini untuk menjadikan pemeriksaan ulas darah sebagai metode deteksi penyakit ALV-J. Ulas darah ayam sakit di warnai terhadap berbagai pewarna kimia: May Grunwald-Giemsa, hematoksilin eosin, asam periodat Schiff, merah kongo, biru toluidin, dan hitam sudan B. Pencirian sitokimia dari komponen seluler sel myelosit dipelajari di bawah mikroskop. Hasil menunjukkan bahwa granula sel myelosit terwarnai dengan baik pada pewarnaan hematoksilin eosin, biru toluidin, asam periodat Schiff dan merah kongo, dan tidak terwarnai pada pewarna May Grunwald-Giemsa, dan hitam sudan B. Penelitian ini dapat dimanfaatkan oleh petugas kesehatan hewan di lapangan dalam mengupayakan pengembangan metode deteksi dini yang praktis dan mudah dari penyakit tumor sel darah myelosit.

Kata kunci : avian leukosis, myeloid leukosis, myelositomatosi, tumor sel darah unggas, ulas darah

¹⁾ Departemen Klinik, Reproduksi dan Patologi, Fakultas Kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor, Telp./Faks: 0251-421807; Email: dratih@yahoo.com

²⁾ Departemen Anatomi, Fisiologi dan Farmakologi, Fakultas Kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor

PENDAHULUAN

Kejadian penyakit tumor sel darah myelosit (myeloid leukosis, ML) akibat avian leukosis subgrup J (ALV-J) sering dideteksi secara histopatologi di laboratorium diagnostik kami dan secara nyata telah mengakibatkan kerugian ekonomi yang cukup nyata bagi para peternak. Berbeda dengan avian influenza (AI) yang menyebabkan kematian massal ayam yang meluas, infeksi virus ALV-J seumpama musuh dalam selimut yang diam-diam menyerang sistem pertahanan tubuh unggas. ALV-J tergolong dalam virus retro, golongan yang sama dengan virus penyebab HIV/AIDS pada manusia. ALV-J mempunyai sifat onkogenik, yaitu mampu melakukan transformasi dan pembentukan sel tumor. ALV-J pada unggas terutama menyerang sel-sel darah putih tipe myelosit dan menyebabkan transformasi sel tumor myelosit atau myelositoma (Arshad *et al.* 1997, Venugopal 1999, Payne dan Venugopal 2000)

Sel myelosit secara normal berasal dari perkembangan sel myeloblast di dalam sumsum tulang dan tidak akan ditemukan pada peredaran darah perifer serta jaringan tubuh (Barnes 1999). Akan tetapi pada kasus infeksi oleh ALV-J, sel myelosit akan dapat ditemukan bersirkulasi di dalam sistem peredaran darah (leukosis) dan berakumulasi dalam jaringan sebagai tumor myelositomatososis (Nakamura *et al.* 2000). Selain menyebabkan tumor sel darah putih tipe myelosit, pertumbuhan tumor myelosit pada organ-organ limfoid menyebabkan penurunan kebalan/imunosupresi pada ayam yang terserang dan berakibat pada kegagalan vaksinasi serta meningkatnya berbagai kasus penyakit di lapangan (Payne *et al.* 1991, Stedman dan Brown 1999).

Sejauh ini deteksi penyakit ALV-J di lapangan dilakukan secara serologis menggunakan metode ELISA (Gingerich *et al.* 2002), tetapi karena biaya operasionalnya yang mahal, deteksi hanya dilakukan pada perusahaan peternakan yang besar dan pemeriksaan hanya dilakukan pada sebagian kecil ayam yang disampel secara acak. Pemeriksaan diagnostik histopatologi memiliki kendala serupa, ditambah masalah lamanya waktu memproses sediaan histopatologi serta penafsirannya memerlukan keahlian khusus.

Pemeriksaan sediaan ulas darah merupakan salah satu cara diagnosis praktis untuk memantau kejadian suatu penyakit di lapangan (Daimon dan Caxton-Martins 1977). Sifat leukosis dari tumor sel myelosit yang beredar di dalam sistem peredaran darah dijadikan dasar pemikiran penelitian ini untuk menjadikan pemeriksaan ulas darah sebagai metode deteksi penyakit ALV-J.

METODE

Sampel berupa darah, sumsum tulang dan jaringan ayam diperoleh dari material diagnostik yang secara rutin dikirim oleh peternak atau dokter hewan lapangan ke Bagian Patologi Fakultas Kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor.

Bahan penelitian berupa bahan untuk pembuatan sediaan histopatologi menggunakan metode blok parafin, Ficoll (SigmaUltra) untuk mengisolasi sel granulosit pada sediaan ulas darah. Beberapa zat kimia pewarnaan, antara lain merah kongo, asam periodat Schiff (PAS), biru toluidin, dan hitam sudan B, serta bahan lain yang digunakan dalam metode pewarnaan umum ulas darah May Grunwald-Giemsa, serta pewarnaan umum jaringan hematoksilin eosin.

Diagnosis penyakit tumor sel darah myelosit ML, ALV-J

Penyakit tumor sel darah myelosit dikonfirmasi melalui pemeriksaan histopatologi dari organ-organ interna meliputi jantung, hati, limpa, paru, ginjal, timus, bursa Fabricius, proventrikulus, dan usus. Sampel organ-organ tersebut dimasukkan ke dalam larutan fiksasi netral bufer formalin 10%, untuk kemudian diproses secara rutin dan ditanam ke dalam blok parafin. Blok parafin kemudian dipotong menggunakan mikrotom setebal 4 μ m dan dilekatkan di atas kaca objek. Sediaan kemudian diwarnai menggunakan pewarnaan hematoksilin eosin dan diamati di bawah mikroskop terhadap adanya kondisi leukosis dari sel myelosit, atau adanya akumulasi sel tumor myelosit pada jaringan (myelositoma).

Pencirian sitokimia granula myelosit

Sampel darah dikumpulkan menggunakan venoject yang telah diberi heparin. Sel granulosit diisolasi dari darah menggunakan metode sentrifugasi

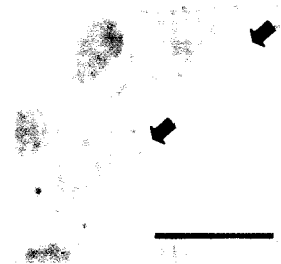
dengan gradien diskontinu Ficoll (SigmaUltra). Setelah terisolasi, sel granulosit dikumpulkan dan diulas di atas permukaan kaca objek (Houwen 1990). Ulas darah kemudian diwarnai dengan berbagai pewarna yang dipilih, yaitu May Grunwald-Giemsa, hematoksilin eosin, asam periodat Schiff, merah kongo, biru toluidin, dan hitam sudan B (Humason 1972). Sebagai kontrol positif pewarnaan sel myelosit, digunakan sel myelosit *immature* yang berada di dalam sumsum tulang. Gumpalan sumsum tulang dikorek dari potongan tulang femur atau tibia, kemudian disentuhkan pada permukaan kaca objek. Sediaan sentuh jaringan sumsum tulang difiksasi dalam metanol dingin dan dicirikan menggunakan berbagai zat pewarna yang sama dengan sampel ulas darah.

HASIL DAN PEMBAHASAN

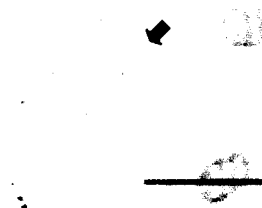
Dari 25 sampel kelompok ayam sakit yang diperiksa secara histopatologis, 10 sampel menunjukkan adanya akumulasi sel tumor myelositoma pada organ internalnya. Ayam-ayam sakit dipilih berasal dari ayam layer (ayam petelur) yang mempunyai masa hidup yang lebih panjang dibandingkan ayam pedaging (broiler). Hewan coba ini beragam usianya antara 5 minggu dan 45 minggu.

Pewarna kimia yang digunakan untuk mencirikan sitokimia granula sel myelosit meliputi 6 jenis pewarnaan, yaitu hematoksilin eosin, May Grunwald-Giemsa, biru toluidin, asam periodat Schiff, merah kongo, dan hitam sudan B.

Perwarna hematoksilin yang dioksidasi dengan penambahan natrium iodat menghasilkan hematin. Hematin akan berwarna biru pada kondisi alkali dan akan berwarna magenta (lebih kemerahan) pada kondisi asam beralkohol (*alcoholic acidic conditions*). Pada kondisi asam beralkohol, hematin berikatan dengan residu lisin pada inti sel. Ikatan ini diperkuat oleh larutan ion logam, yaitu aluminium yang ditambahkan pada pembuatan larutan hematoksilin (Kiernan 1990). Detail sel lebih terlihat dengan penambahan pewarna eosin. Eosin mewarnai sitoplasma menjadi merah muda. Sebagian granula sel myelosit menyerap warna merah pada pewarnaan hematoksilin eosin, sebagian granula terlihat berwarna merah dalam sitoplasma (Gambar 1a dan 1b).

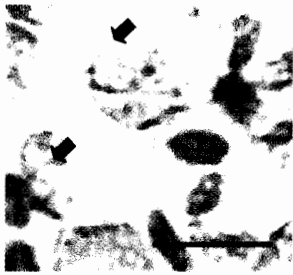


Gambar 1a Sel myelosit pada sumsum tulang, dengan pewarnaan hematoksilin eosin. Sebagian granula myelosit menyerap warna merah. Skala = 1 μ m



Gambar 1b Sel myelosit pada ulas *buffy coat*, dengan pewarnaan hematoksilin eosin. Sebagian granula myelosit menyerap warna merah. Skala = 1 μ m

Pewarna giemsa merupakan salah satu pewarna yang tergolong dalam kelompok pewarna Romanowsky. Giemsa merupakan campuran dari biru metilena dan eosin. Kedua pewarna biru metilena dan eosin masing-masing dapat larut dalam air, tetapi bila kedua pewarna tersebut dicampurkan akan membentuk endapan berwarna gelap yang hanya larut dalam metanol. Giemsa mewarnai sitoplasma menjadi merah muda dan inti menjadi biru. Derajat warna biru pada pewarna giemsa dapat beragam dari ungu hingga magenta bergantung pada derajat biru metilena yang terdegradasi saat berikatan dengan eosin. Dalam pH rendah, biru metilena mewarnai asam nukleat inti dan karbohidrat (Kiernan 1990). Granula sel myelosit tidak menyerap warna pada pewarnaan giemsa, dan granula terlihat sebagai butiran jernih dalam sitoplasma (Gambar 2a dan 2b).



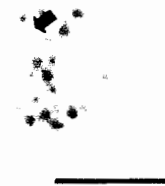
Gambar 2a. Sel Myelosit pada sumsum tulang, dengan pewarnaan May-Grunwald Giemsa. Granula myelosit tidak menyerap warna. Skala = 1 μm



Gambar 3a Sel myelosit pada sumsum tulang, dengan pewarnaan biru toluidin. Granula myelosit menyerap warna biru. Skala = 1 μm



Gambar 2b Sel myelosit pada ulas *buffy coat*, dengan pewarnaan May-Grunwald Giemsa. Granula myelosit terlihat berwarna jernih. Skala = 1 μm



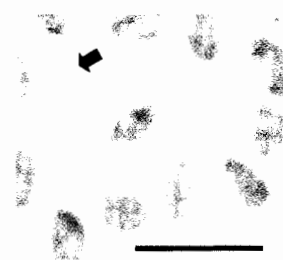
Gambar 3b Sel myelosit pada ulas *buffy coat*, dengan pewarnaan biru toluidin. Granula myelosit bersifat orthokromatik. Skala = 1 μm

Pewarna biru toluidin dapat mewarnai komponen seluler menjadi merah atau biru. Jika warna yang dihasilkan sesuai dengan warna asli zat pewarna (biru) maka dikatakan bahwa granula bersifat orthokromatik tetapi apabila warna yang dihasilkan menjadi berbeda (merah) maka dikatakan granula bersifat metakromatik (Kiernan 1990). Tujuh granula sel myelosit menyerap warna biru pada pewarnaan biru toluidin, mencirikan sifat ortokromatik dari butiran granula myelosit (Gambar 3a dan 3b).

Asam periodat mengoksidasi komponen 1,2-glikol dari karbohidrat menghasilkan aldehida yang jika bereaksi dengan reagen Schiff menghasilkan warna merah. Selain pada ikatan karbohidrat, komponen 1,2 glikol juga ditemukan beberapa gugus hidroksil asam amino yang berikatan dengan karbohidrat seperti polisakarida, mukopolisakarida, glikoprotein dan glikolipid (Kiernan 1990). Granula sel myelosit menyerap warna merah pada pewarnaan asam periodat Schiff, mencirikan kandungan karbohidrat dari butiran granula myelosit (Gambar 4a dan 4b).



Gambar 4a Sel myelosit pada sumsum tulang, dengan pewarnaan asam periodat Schiff. Granula myelosit menyerap warna merah. Skala = 1 μm



Gambar 4b Sel myelosit pada ulas *buffy coat*, dengan pewarnaan asam periodat Schiff. Granula myelosit mengandung massa karbohidrat. Skala = 1 μm

Pewarna merah kongo dapat mendeteksi ikatan nonpolar hidrogen pada karbohidrat dengan memberi warna merah jingga. Khusus untuk amyloid, pewarna ini dapat berpendar jika dilihat menggunakan mikroskop fluoresens. Akan tetapi material lain seperti kolagen atau karbohidrat tidak memperlihatkan efek berpendar dengan mikroskop fluoresens (Kiernan 1990). Granula sel myelosit menyerap warna merah jingga pada pewarnaan merah kongo tetapi tidak menunjukkan efek berpendar menggunakan mikroskop fluoresens mencirikan kandungan karbohidrat butiran granula myelosit adalah bukan amyloid (Gambar 5a dan 5b).



Gambar 5a Sel myelosit pada sumsum tulang, dengan pewarnaan merah kongo. Granula myelosit menyerap warna merah jingga. Skala = 1 μ m



Gambar 5b Sel myelosit pada ulas *buffy coat*, dengan pewarnaan merah kongo. Granula myelosit berwarna merah jingga menunjukkan granula myelosit mengandung massa karbohidrat. Skala = 1 μ m

Hitam sudan B mewarnai komponen asam dari lipid. Kandungan lipid akan terlihat berwarna hitam dengan pewarnaan ini (Kiernan 1990). Granula sel myelosit tidak menyerap warna pada pewarnaan hitam sudan B menunjukkan bahwa granula sel myelosit tidak berisi komponen lipid (Gambar 6a dan 6b).



Gambar 6a Sel myelosit pada sumsum tulang, dengan pewarnaan hitam sudan B. Granula myelosit tidak menyerap warna. Skala = 1 μ m



Gambar 6b Sel myelosit pada ulas *buffy coat*, dengan pewarnaan hitam sudan B. Granula myelosit tidak berwarna menunjukkan granula myelosit tidak mengandung komponen lipid. Skala = 1 μ m

KESIMPULAN

Dari pewarna kimia yang digunakan untuk mencirikan sitokimia granula sel myelosit menggunakan pewarna hematoksilin eosin, May Grunwald-Giemsa, biru toluidin, asam periodat Schiff, merah kongo, dan hitam sudan B, granula sel myelosit menunjukkan reaksi positif pada pewarnaan hematoksilin eosin, biru toluidin, asam periodat Schiff, dan merah kongo. Tidak ada pewarnaan dengan May Grunwald-Giemsa dan hitam sudan B.

Perlu dilakukan penelitian lanjutan mengenai penerapan teknik histokimia dalam mendeteksi kejadian penyakit sel tumor darah myelosit pada unggas-unggas sakit di lapangan.

DAFTAR PUSTAKA

Arshad SS, Howes K, Barron GS, Smith LM, Russel PH, Payne LN. 1977. Tissue tropism of the HPRS-103 strain of J subgroup avian leukosis virus and of a

- derivative acutely transforming virus. *Vet Pathol* 34(2):127-137.
- Barnes HJ. 1999. *Hemic System, Avian Histopathology*. The American Association of Avian Pathologist. Edisi ke 2.
- Daimon T, Caxton-Martins A. 1977. Electron microscopic and enzyme cytochemical studies on granules of mature chicken granular leukocytes. *J Anat* 123:533-562.
- Gingerich E, Porter RE, Lupiani B, Fadly AM. 2002. Diagnosis of myeloid leukosis induced by a recombinant avian leukosis virus in commercial white leghorn egg laying flocks. *Avian Dis* 46:745-748
- Houwen B. 1990. Blood film preparation and staining procedures. *Lab Hematol* 6:1-7 .
- Humason GL. 1972. Animal tissue techniques. WH Freeman and Co.
- Kiernan JA. 1990. *Histological and Histochemical Methods: Theory and Practice*. New York: Pergamon Press.
- Nakamura N, Ogiso M, Tsukamoto K, Hamazaki N, Hihara H, Yuasa N. 2000. Lesions of bone and bone marrow in myeloid leukosis occurring naturally in adult broiler breeders. *Avian Dis* 44:215-221.
- Payne LN, Gillespie AM, Howes K. 1991. Induction of myeloid leukosis and other tumors with the HPRS-103 strain of ALV. *Vet Rec* 129:447-448 .
- Payne LN, Venugopal K. 2000. Neoplastic diseases: Marek's disease, avian leukosis and reticulo-endotheliosis. *Rev Sci Tech off Int Epiz* 19:544-564.
- Stedman NL, Brown TP. 1999. Body weight suppression in broiler naturally infected with avian leukosis virus subgroup. *J Avian Dis* 43:604-610.
- Venugopal K. 1999. Avian Leukosis Virus Subgroup J: a Rapidly evolving group of oncogenic retroviruses. *Res In Vet Sci* 67:113-119.