

Pemeriksaan Sitogenetik di Laboratorium Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada

Oleh: Risanto Siswosudarmo

Seksi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta

ABSTRACT

Risanto Siswosudarmo — *Cytogenetic examination*

Cytogenetic examination on six normal persons, four men and two women, was carried out using a technique proposed by Dutrillaux with slight modification. Five drops of blood were taken from a peripheral vessel and was incubated on a PHA (phytohemagglutinine)-containing medium at 37°C for about 72 hours. Cell division was blocked by adding colchicine solution, an antimitotic agent, into this medium. A mixture of distilled water, magnesium chloride, hyaluronidase, and goat serum was used as hypotonic shock solution. Two out of these six examinations showed good results. The possibility of using this technique to examine some clinical syndromes, such as Down, Turner, and Klinefelter syndromes, as well as 13 and 18 trisomies, has also been discussed.

Key Words: cytogenetics — chromosome — blood culture — colchicine — hypotonic shock solution

PENDAHULUAN

Sudah sejak lama diketahui bahwa inti sel makhluk hidup, baik tumbuhan maupun hewan, mengandung butir-butir yang dapat mengikat zat warna. Pada saat sel siap membelah, benda-behda tersebut mengadakan individualisasi, sehingga bentuknya dapat dikenal dan selanjutnya disebut kromosom (Latin: *chromosoma*, *chrom*, warna, dan *soma*, benda) (Ham, 1970).

Pengetahuan tentang kromosom manusia sudah sejak lama dirintis oleh para ahli. Antara tahun 1897 sampai 1912 para penyelidik berpendapat bahwa jumlah kromosom manusia adalah antara 16 sampai 36. Pada tahun 1912 Winiwarter mulai mendekati kebenaran. Ia mengatakan bahwa laki-laki mempunyai 47 kromosom, sedang wanita 48. Meskipun demikian, sampai awal tahun 1950, jumlah kromosom manusia masih menjadi perdebatan (Dutrillaux, 1975).

Akhirnya pada tahun 1956 Tjio dan Levan, dengan menggunakan kultur jaringan embrional manusia dan dengan suatu teknik *shock* hipotonik, berhasil menemukan dengan pasti bahwa sel soma manusia mengandung 46 kromosom (Tjio & Levan, 1956). Penemuan ini sungguh merupakan titik tolak penyelidikan-penyelidikan yang mendalam tentang kromosom manusia. Ini terbukti dengan ditemukannya kelainan kromosom yang pertama oleh Lejeune *et al.* (1959).

Tulisan ini dimaksudkan untuk membahas segi teknik pemeriksaan, hasil-hasil yang diperoleh, dan kesulitan-kesulitan yang dihadapi. Selain itu, dibahas pula kemungkinan-kemungkinan penerapannya pada kasus-kasus kelainan kromosom.

BAHAN

Media dasar yang digunakan ialah "TC Chromosome Microtest Medium" yang merupakan media siap pakai. Media ini diperoleh dari pabrik Difco Laboratories (USA). Bahan lain yang penting ialah bahan penyusun larutan *shock* hipotonik yang terdiri atas aqua destillata klorida magnesium, hialuronidase, dan serum kambing. Hialuronidase diperoleh dari pabrik Choy (Paris), sedang yang lain dapat dibuat sendiri.

Pemeriksaan kromosom dilakukan terhadap 6 individu normal dengan jenis kelamin berbeda.

CARA KERJA

Teknik pemeriksaan yang digunakan di laboratorium-laboratorium sitogenetika cukup banyak. Pada kesempatan ini penulis mencoba menerapkan salah satu teknik konvensional seperti yang dianjurkan oleh Dutrillaux (1975), yaitu dengan menggunakan kultur darah perifer, tetapi dengan sedikit modifikasi berhubung dengan tidak seluruh zat-zat yang dianjurkan dapat diperoleh di sini.

Secara singkat, urutan pemeriksaan adalah sebagai berikut (lihat LAMPIRAN):

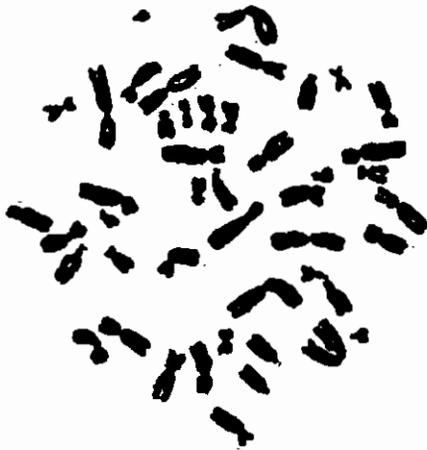
- 1) Dilakukan kultur darah selama 72 jam, sehingga sel-sel dalam keadaan membelah (mitosis),
- 2) mitosis dihentikan pada fase metafasis dengan menambahkan larutan kolisin,
- 3) dilakukan *shock* hipotonik supaya kromosom tersebar, dan
- 4) preparasi di atas gelas obyek.

Analisa dapat dilakukan baik secara langsung di bawah mikroskop, maupun dengan membuat foto terlebih dahulu. Kariotip disusun berdasarkan atas nomenklatur Denver 1960, Chicago 1966 dan Paris 1971.

HASIL

Pertebaran kromosom sebuah sel, yang sedang dalam fase metafasis dari suatu pembelahan mitosis, dapat dilihat pada GAMBAR 1A dan 2A, berturut-turut berasal dari laki-laki dan wanita normal.

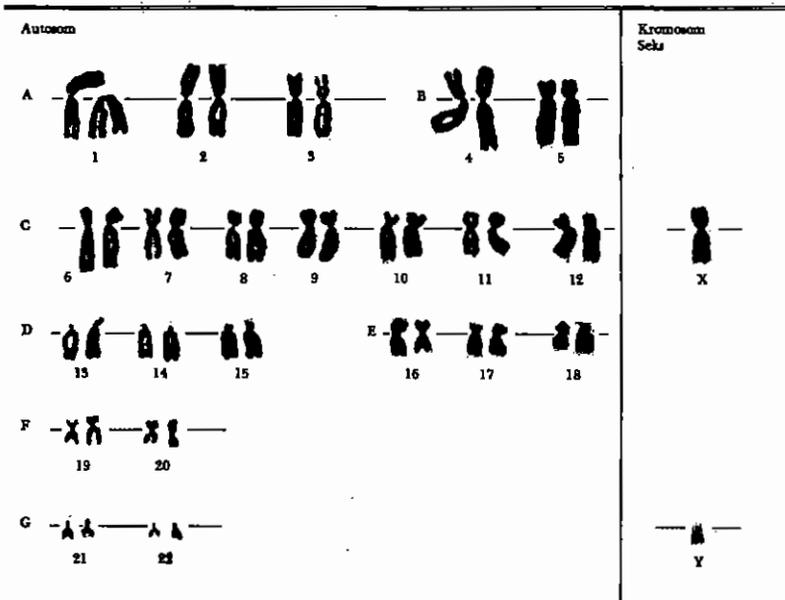
Kariotip kedua individu tersebut berturut-turut dapat dilihat pada GAMBAR 1B dan 2B. Perhatikan bahwa laki-laki normal mempunyai 46 kromosom yang terdiri atas 22 pasang autosom dan 2 kromosom seks X dan Y, sedang wanita mempunyai 46 kromosom yang terdiri atas 22 pasang autosom dan 2 kromosom seks X dan X.



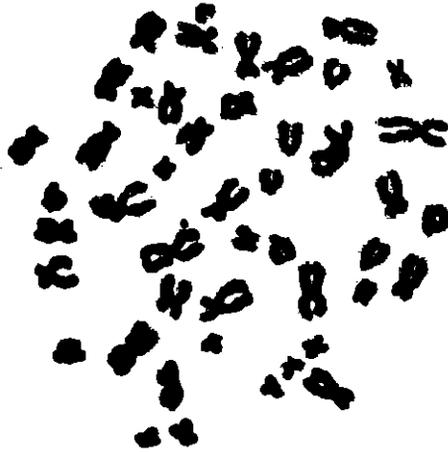
GAMBAR 1. -- A. Pertebaran kromosom pada seorang laki-laki normal. diambil dari kultur limfosit, fase metafasis.

UNIVERSITAS GADJAH MADA
 FAKULTAS KEDOKTERAN
 Bagian Anatomi, Embryologi,
 dan Antropologi

KARIOTIP
 No :
 Nama : Rst
 Umur / Jenis : 30 th / Laki-laki
 Diag. klin. : NORMAL
 Diag. kron. : 46 XY



B. Kariotip dari GAMBAR 1A. Kromosom tersusun dalam 22 pasang autosom (kromosom no. 1 s/d 22) dan 2 kromosom seks X dan Y. Perhatikan adanya satelit, yang nampak jelas pada kromosom no. 13, 14, dan 21.

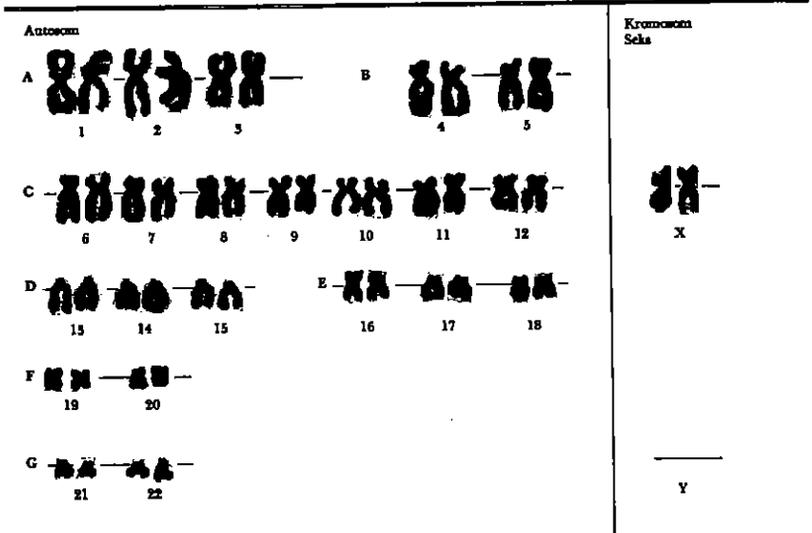


GAMBAR 2. — A. Pertebaran kromosom pada seorang wanita normal, diambil dari kultur limfosit, fase metafasis.

UNIVERSITAS GADJAH MADA
 FAKULTAS KEDOKTERAN
 Bagian Anatomi, Embryologi,
 dan Antropologi

KARIOTIP

No :
 Nama : C
 Umur / Jenis : 45 th / ♀
 Diag. klin. : NORMAL
 Diag. kron. : 46, XX.



B. Kariotip dari GAMBAR 2A. Kromosom tersusun dalam 22 pasang autosom dan 2 kromosom seks X dan X.

PEMBAHASAN

Pemeriksaan sitogenetik menjadi semakin populer sejak Tjio dan Levan (1956) menemukan dengan pasti bahwa jumlah kromosom manusia adalah 46. Penemuan yang gemilang ini adalah berkat ditemukannya metode *shock* hipotonik, sehingga sel membengkak dan kromosom dapat tersebar. Tjio dan Levan menggunakan kultur jaringan, sehingga fase-fase pembelahan sel dapat diperhitungkan.

Jauh sebelum itu, kromosom diperiksa secara langsung dari organ-organ yang mempunyai aktivitas membelah tinggi, misalnya sumsum tulang atau testis. Karena jumlah kromosom manusia relatif banyak, maka identifikasi dan penghitungannya dengan cara demikian cukup sulit.

Teknik pemeriksaan kromosom yang sekarang banyak dipakai adalah dengan menggunakan kultur jaringan. Jaringan yang dipakai dapat fibroblas, sumsum tulang, darah, testis dll (Grouchy & Turleau, 1977).

Kultur darah rupanya merupakan metoda yang paling mudah; terutama dari segi teknik pengambilannya. Dalam hal ini hanya dibutuhkan waktu 3 sampai 5 tetes darah perifer dan dapat diambil dari ujung jari atau pada neonatus dari plasenta.

Pada percobaan ini media kultur yang digunakan ialah "TC Chromosome Microtest Medium". Medium ini mengandung fitohemagglutinin ("PHA, phytohemagglutinine") yang berfungsi memacu sel (limfosit) supaya membelah. Selanjutnya pembelahan sel dihentikan pada fase metafasis dengan menambahkan larutan kolkisin, suatu zat yang mempunyai sifat antimitotik.

Untuk memperoleh penyebaran kromosom yang baik, diberikan perlakuan *shock* hipotonik. Pada percobaan ini digunakan campuran aqua destillata klorida magnesium, hialuronidase, dan serum kambing. Komposisi larutan ini sesuai dengan yang dianjurkan oleh Dutrillaux (1975), hanya saja serum anak kuda diganti dengan serum kambing yang lebih mudah memperolehnya. Ternyata hasil yang diperoleh cukup memuaskan.

Kariotip disusun berdasarkan nomenklatur Denver 1960 dan Chicago 1966, yaitu berdasarkan besar kromosom, letak sentromer, dan apakah mereka mempunyai satelit atau tidak (Makino, 1975). Kelompok-kelompok diberi nama A, B, C, D, E, F, dan G dan tiap-tiap kromosom diberi nomor dari 1 sampai 22. Kromosom X adalah kromosom kelompok C yang serupa dengan kromosom no. 6, sedang kromosom Y adalah kromosom kelompok G dengan lengan panjang lebih lurus dan tidak mempunyai satelit.

Meskipun teknik ini cukup sederhana, namun kesulitan-kesulitan yang dijumpai selama melakukan percobaan ini tidaklah sedikit. Dari 6 kali percobaan yang dilakukan hanya dua saja yang menunjukkan hasil yang memuaskan. Penulis beranggapan bahwa kegagalan-kegagalan ini disebabkan faktor-faktor sebagai berikut:

- a) Media yang sudah tidak baik lagi, yang mungkin disebabkan oleh kerusakan yang terjadi selama transportasi dari pabrik ke tempat tujuan.

- b) Gangguan pada aliran listrik yang menyebabkan terganggunya kultur. Gangguan aliran listrik merupakan hal yang tidak jarang terjadi di laboratorium kami.
- c) Sterilitas, yang dapat diketahui dari terlihatnya kuman-kuman pada pemeriksaan mikroskopik.

Dengan teknik yang sederhana ini pula, kami berharap dapat melakukan analisa kariotip terhadap penderita-penderita yang diduga (secara klinik) mempunyai kelainan kromosom. Aberasi kromosom yang paling mudah dilihat adalah yang menyangkut jumlah, sedang kelainan yang menyangkut bentuk, struktur, translokasi dll memerlukan teknik yang lebih rumit, yaitu perlu dilakukan denaturasi atau "banding" (pemitaan). Dengan demikian sindroma klinik seperti misalnya sindroma Down atau trisomi 21 ($47 XY + 21$ atau $47 XX + 21$), sindroma Turner ($45 XO$), sindroma Klinefelter ($47 XXY$), trisomi 13, 18 dll diharapkan akan dapat ditegakkan dengan teknik pemeriksaan tersebut di atas.

KESIMPULAN

1. Telah dilakukan pemeriksaan kromosom terhadap enam individu normal, dua di antaranya menunjukkan hasil yang memuaskan. Pemeriksaan pada laki-laki menunjukkan adanya 46 kromosom dengan dua kromosom seks X dan Y, sedang wanita 46 kromosom dengan dua kromosom seks X dan X.
2. Teknik yang digunakan ialah kultur darah perifer, yang merupakan teknik yang paling banyak digunakan dalam laboratorium-laboratorium sitogenetika karena relatif paling mudah. Telah dibahas pula cara-cara preparasinya.
3. Kesulitan yang paling banyak dijumpai datang dari faktor media, gangguan listrik, sterilitas dan faktor ketrampilan pemeriksa.
4. Dibahas pula kemungkinan penggunaannya untuk memeriksa kelainan-kelainan klinik seperti sindroma Down, Turner, Klinefelter, trisomi 13, 18 dll.

KEPUSTAKAAN

- Dutrillaux, B. 1975 *Sur la Nature et l'Origine des Chromosomes Humains*. Expansion Scientifique, Paris.
- Grouchy, Jd., & Turleau, C. 1977 *Atlas des Maladies Chromosomiques*. Expansion Scientifique, Paris.
- Ham, A. W. 1970 *Histology*, 7th ed. J. B. Lippincott Co., Philadelphia.
- Lejeune, J., Gautier, M., & Turpin, R. 1959 Les chromosomes humains en culture de tissu. *C. R. Acad. Sci.* 248:141-6.
- Makino, S. 1975 *Human Chromosome*. Igaku Shoin Ltd., Tokyo.
- Tjio, J. H., & Leven, A. 1956 The chromosome number in man. *Hereditas* 42:1-6.

LAMPIRAN**Teknik Pemeriksaan Kromosom di Laboratorium Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada****A. Bahan-bahan pokok**

1. Media: TC Chromosome Microtest Medium, Difco (USA).
2. Bahan yang diperiksa: darah perifer.
3. Larutan *shock* hipotonik

Komposisi adalah sebagai berikut:

- aqua destillata 25 bagian
- $MgCl_2$ 2 gram/100 ml diencerkan 6 kali, 2 bagian
- hialuronidase 50 u/ml, 1,5 bagian
- serum kambing 5 bagian.

4. Larutan fiksatif

Komposisinya sebagai berikut:

- alkohol absolut 6 bagian
- kloroform 3 bagian
- asam asetat glasial 1 bagian.

5. Larutan pencuci, hanya untuk mencuci alat-alat gelas:

Komposisinya sebagai berikut:

- bikromat kalium 100 gram
- H_2SO_4 murni 500 cc
- aqua destillata 1000 cc.

B. Teknik/cara kerja

- Diambil 5 tetes darah perifer dan dimasukkan ke dalam media. Diinkubasikan pada temperatur $37^\circ C$ selama 72 jam, kemudian ditambah larutan kolkisin selama 2-3 jam, dan kultur diakhiri.
- Manipulasi berikutnya adalah sebagai berikut:
 - Seluruh isi kultur dimasukkan ke dalam tabung konik ukuran 12 cc.
 - Disentrifus selama 10 menit pada 800 putaran per menit. Semua sentrifugasi berlangsung pada waktu dan kecepatan tersebut.
 - Supernatan dibuang.
 - Ke dalam endapan ditambahkan 3 cc larutan *shock* hipotonik yang telah dipanaskan pada $37^\circ C$. Penambahan dilakukan 3 kali, masing-masing 1 cc. Setiap penambahan, sel-sel diresuspendi.
 - Diinkubasi lagi selama 10 menit, $37^\circ C$.
 - Disentrifus kembali.
 - Supernatan dibuang, dan ditambahkan larutan fiksatif sebanyak 3 cc. Diadakan resuspensi sel-sel, dan dibiarkan pada temperatur kamar selama 30 menit.
 - Disentrifus kembali.
 - Supernatan dibuang dan ditinggalkan kurang lebih 0,5 cc larutan fiksatif. Sel-sel diresuspendi.
 - Dengan pipet pastur, suspensi sel-sel diteteskan pada gelas obyek dari ketinggian kurang lebih 10 cm, satu atau dua tetes.

- Dikeringkan di udara, kemudian dicat dengan Giemsa (1:20) selama 20 menit. Cat dibuang, dicuci dengan aqua destillata dan dikeringkan di udara.
 - Diperiksa di bawah mikroskop dan dibuat foto.
-