

Cytomorphometry Peripheral Blood Mononuclear Cell Anjing Kintamani Bali

(CYTOMORPHOMETRY OF PERIPHERAL BLOOD MONONUCLEAR CELL IN
KINTAMANI BALI DOG)

Putu Ayutia Areningrat¹, I Gusti Ayu Agung Suartini², Iriani Setyawati³

¹Mahasiswa Pendidikan Sarjana Kedokteran Hewan,

²Laboratorium Biokimia Veteriner,

Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Udayana,

Jl. P.B. Sudirman, Denpasar, Bali, Indonesia, 80234; Telp/Fax: (0361) 223791,

³Laboratorium Struktur dan Perkembangan Hewan,

Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Udayana,

Jl. Raya Kampus Unud, Kuta, Badung, Bali, Indonesia, 80361; Telp/Fax (0361701954 ext.235)

e-mail: tiahyunjoong@gmail.com

ABSTRAK

Anjing kintamani bali (AKB) adalah kelompok anjing lokal jenis pegunungan yang hidup di sekitar Desa Sukawana, Kecamatan Kintamani, Kabupaten Bangli, Bali. Anjing kintamani bali merupakan plasma nutfah asli Indonesia yang sangat perlu dijaga kelestarian dan kemurniannya. *Peripheral blood mononuclear cell* (PBMC) sebagai komponen penting sistem kekebalan tubuh yang terlibat dalam imunitas humoral dan seluler, dapat digunakan untuk memonitor perkembangan penyakit atau respon terhadap pengobatan serta menemukan biomarker yang valid dalam kompartemen sel darah. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui ukuran sel limfosit dan sel monosit pada AKB sehat yang dievaluasi berdasarkan pemeriksaan *cytomorphometry*. Penelitian ini merupakan penelitian eksploratif menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) pola faktorial AxB. Data dianalisis dengan analisis ragam dan disajikan dalam bentuk tabel, grafik, dan gambar. Berdasarkan hasil penelitian, AKB memiliki nilai *cytomorphometry* yaitu diameter sel limfosit (7,312-8,761 μ m), diameter nukleus limfosit (5,786-7,138 μ m), diameter sel monosit (7,785-8,883 μ m), diameter nukleus monosit (6,099-7,457 μ m), *circumference* sel limfosit (23,131-27,737 μ m), *circumference* nukleus limfosit (18,160-22,402 μ m), *circumference* sel monosit (24,514-27,966 μ m), *circumference* nukleus monosit (19,093-23,442 μ m), *surface area* sel limfosit (42,318-60,140 μ m²), *surface area* nukleus limfosit (27,331-40,308 μ m²), *surface area* sel monosit (48,313-62,334 μ m²), *surface area* nukleus monosit (28,979-43,736 μ m²), luas sitoplasma sel limfosit (8,863-27,509 μ m²), dan luas sitoplasma sel monosit (12,230-25,953 μ m²).

Kata-kata kunci: anjing kintamani bali; *peripheral blood mononuclear cell*; *cytomorphometry*

ABSTRACT

Kintamani bali dogs (KBD) is a group of local mountain dogs that live around Sukawana Village, Kintamani District, Bangli Regency, Bali. Kintamani bali dog is a original Indonesian germplasm that needs to be preserved and purified. Peripheral blood mononuclear cell (PBMC) as an important component of the immune system involved in humoral and cellular immunity, can be used to monitor disease progression or therapy to responses, and to found valid biomarkers in the blood cell compartment. This study aimed to determine the size of healthy KBD lymphocyte and monocyte cells which were evaluated based on the *cytomorphometry* examination. This study was a exploratory study used a Completely Randomized Design (CRD) with AxB factorial pattern. Data were analyzed with a variance analysis and presented in tables, graphs and figures. Based on the results of the study, the *cytomorphometry* value of KBD i.e. lymphocyte cell diameter (7.312-8.761 μ m), nucleus diameter of lymphocyte cell (5.786-7.138 μ m), monocyte cell diameter (7.785-8.883 μ m), nucleus

diameter of monocyte cell (6,099-7,457 μm), lymphocyte cell circumference (23.131-27.737 μm), nucleus circumference of lymphocyte cell (18.160-22.402 μm), monocyte cell circumference (24.514-27.966 μm), nucleus circumference of monocyte cell (19.093-23.442 μm), lymphocyte cell surface area (42.318-60.140 μm^2), nucleus surface area of lymphocyte cell (27.331- 40.308 μm^2), monocyte cells surface area (48.313-62.334 μm^2), nucleus surface area of monocyte cell (28.979-43.736 μm^2), lymphocyte cells cytoplasmic area (8.863-27.509 μm^2) and monocyte cell cytoplasm area (12.230-25.953 μm^2).

Keywords: kintamani bali dog; *peripheral blood mononuclear cell*; *cytomorphometry*

PENDAHULUAN

Anjing kintamani bali (AKB) adalah sebutan kelompok anjing lokal jenis pegunungan yang hidup di sekitar Desa Sukawana, Kecamatan Kintamani, Kabupaten Bangli, Bali. Anjing kintamani bali sebagai plasma nutfah asli Indonesia sangat perlu dijaga kelestarian dan kemurniannya. Anjing kintamani bali memiliki penampilan yang sangat indah dan cantik dengan karakter pemberani, tangkas, waspada, pandai dan mudah dilatih serta setia pada pemiliknya. Anjing kintamani bali digunakan sebagai maskot fauna Kabupaten Bangli, Bali karena keistimewaannya (Puja *et al.*, 2012). Popularitas AKB harus didukung dengan kualitas anjing tersebut, salah satunya dengan memperhatikan status kesehatannya. Selama ini dalam memilih AKB yang sehat dan berkualitas hanya didasarkan pada morfologi atau pemeriksaan fisik saja, sehingga jika AKB tersebut menderita suatu penyakit subklinis maupun genetik akan sulit untuk di deteksi. Pemeriksaan hematologi dan kimia darah memiliki peranan yang penting dalam menentukan kesehatan fisik, diagnosis dan prognosis dari penyakit (Suwanachat *et al.*, 2012).

Peripheral blood mononuclear cell (PBMC) merupakan sel darah putih yang memiliki inti tunggal berbentuk bulat, terdiri atas sel limfosit dan sel monosit atau makrofag (Jalal dan Salimi, 2015). *Peripheral blood mononuclear cell* (PBMC) dapat diperoleh relatif mudah dari sampel darah yang dikumpulkan secara rutin, sehingga dapat memberikan akses langsung ke fisiologis yang relevan. Sel mononuklear banyak digunakan dalam penelitian dan aplikasi klinis seperti dalam bidang mikrobiologi, virologi, onkologi, pengembangan vaksin, transplantasi dan biologi regeneratif, dan toksikologi (Warnasih *et al.*, 2016).

Analisis mikroskopis sel darah yang didukung oleh *cytomorphometry* dapat mendeteksi perubahan sel secara kasat mata (Maiolino *et al.*, 2002). Analisis *cytomorphometry* atau analisis gambaran sel yang telah disarankan sebagai pendekatan kunci untuk menentukan dan mengidentifikasi perubahan seluler dan nuklear dalam apusan sitologi (Sakuma *et al.*, 2012). Pemeriksaan *cytomorphometry* merupakan aspek penting dari

hematologi yang dapat mengungkapkan kondisi fisiologis organisme (Ananya *et al.*, 2014). *Cytomorphometry* menjadi penting bagi dunia kedokteran hewan karena merupakan deskripsi kuantitatif suatu struktur geometris serta memberikan objektivitas numerik dan modifikasi paling sesuai untuk pendugaan visual. Informasi ini akan membantu penentuan kasus kesehatan hewan, sebagai karakterisasi morfometri sel darah.

Belum banyak literatur mengenai AKB, terutama mengenai ukuran PBMC AKB sehat, sehingga belum terdapat acuan sebagai data awal ukuran sel limfosit dan sel monosit pada AKB sehat. Hal ini sangat penting, mengingat AKB merupakan plasma nutfah yang harus kita lestarikan keberadaannya. Dengan mengacu pada latar belakang diatas maka penelitian ini penting dilakukan sebagai data awal untuk mengetahui ukuran sel limfosit dan sel monosit pada AKB sehat.

MATERI DAN METODE

Penelitian ini menggunakan PBMC pada sel limfosit dan sel monosit yang diperoleh dari darah lengkap AKB sehat berjumlah 20 sampel yang terdiri atas AKB jantan dan betina muda (<12 bulan) masing-masing 5 sampel dan AKB jantan dan betina dewasa (>12 bulan) masing-masing 5 sampel yang diambil sebanyak 1 kali. Bahan dan alat yang digunakan dalam penelitian ini meliputi darah lengkap AKB sehat, EDTA (*Ethylene Diamine Tetraacetic Acid*), NH₄Cl (*Ammonium Chloride*), PBS (*Phospat Buffered Saline*), larutan giemsa, aquades, alkohol, syringe 3 ml, *coolbox*, *ice gel*, gunting, kapas, *tourniquet*, *handscoon latex*, mikro titer, alat sentrifugasi, tabung reaksi mikrotube, *glass object*, *cover glass*, gelas fiksasi (*coplin jar*), rak pewarna, mikroskop dan kamera mikroskopis OPTILAB (Rahayu *et al.*, 2016).

Pengambilan darah dilakukan pada *vena cephalica* sebanyak ± 1-3 ml, kemudian dimasukkan ke dalam tabung yang telah diisi antikoagulan (EDTA). Sampel tersebut dibuat preparat ulas darah dan selanjutnya PBMC dari AKB akan diukur selnya menggunakan pemeriksaan *cytomorphometry*. Anjing kintamani bali tersebut dipelihara di Dinas Peternakan dan Perikanan Kabupaten Bangli, tepatnya di Desa Sukawana, Kecamatan Kintamani, Kabupaten Bangli, Bali. Darah yang sudah dikoleksi kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm dalam waktu 5 menit pada suhu 10°C. Setelah itu darah dilisiskan menggunakan NH₄Cl sebanyak 9 ml dan dicuci dengan PBS kemudian disentrifugasi kembali dengan kecepatan 3000 rpm selama 5 menit pada suhu 10° celcius hingga hanya tersisa *buffy*

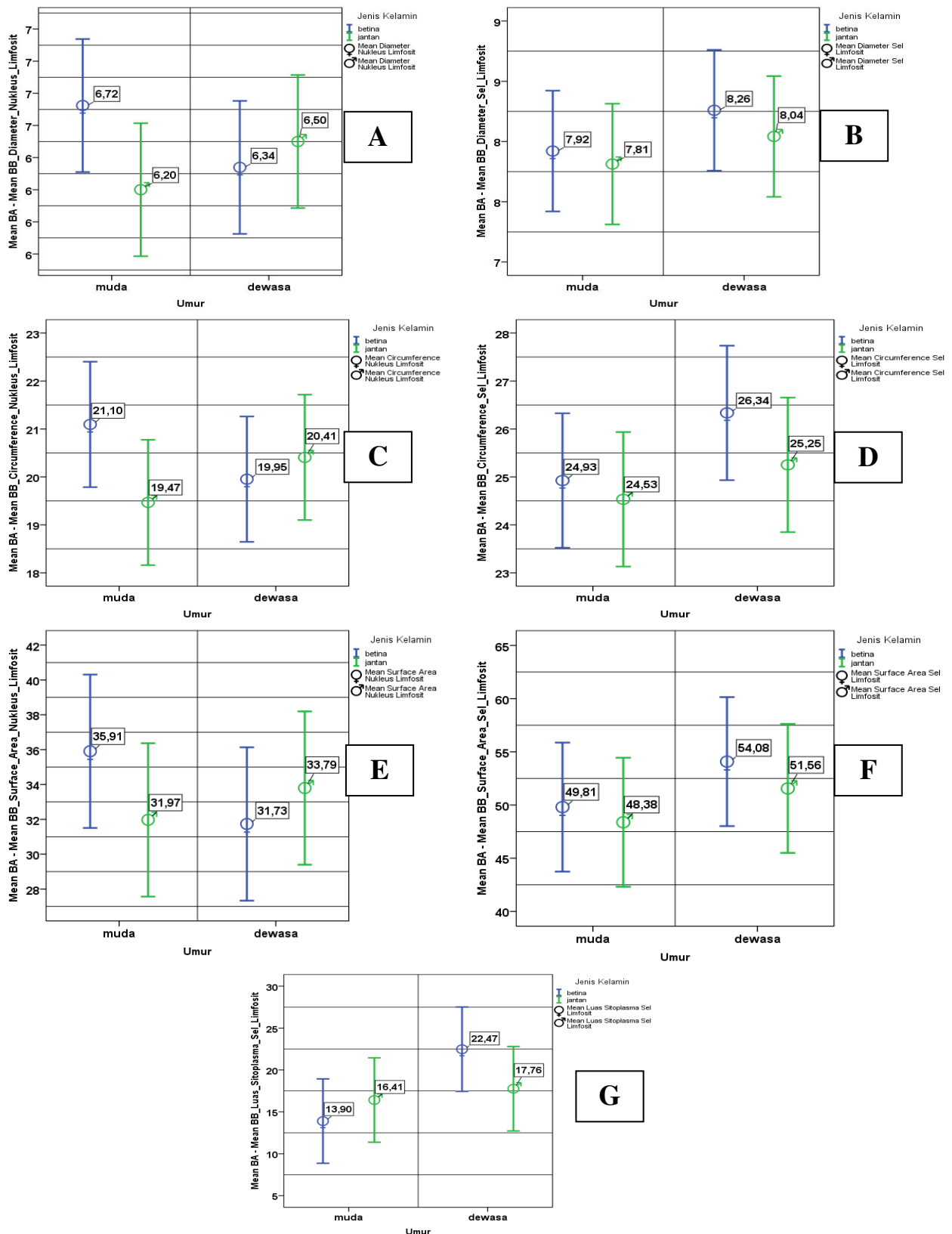
coat saja, kemudian selanjutnya dibuat preparat ulas PBMC dan diwarnai dengan pewarnaan Giemsa.

Penelitian ini merupakan penelitian deskriptif eksploratif yang bertujuan untuk menentukan ukuran sel limfosit dan sel monosit AKB melalui pemeriksaan *cytomorphometry*. Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL), pola faktorial AxB dengan faktor A yaitu jenis kelamin (jantan dan betina), dan faktor B yaitu umur (< 12 bulan dan > 12 bulan) sehingga kombinasi antar faktor sebanyak 2x2. Dari hasil rumus $P(n-1) > 15$, maka pengulangan dilakukan sebanyak 5 kali.

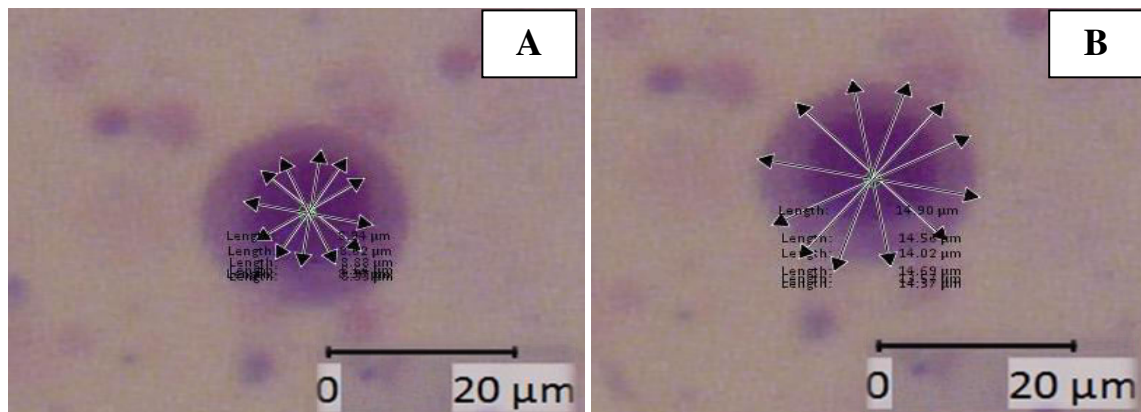
Pengumpulan data dilakukan dengan mengamati preparat AKB sehat pada 5 lapang pandang menggunakan mikroskop dengan pembesaran lensa 400x. Kemudian dilakukan pengambilan gambar menggunakan kamera mikroskopis OPTILAB dengan *software* OPTILAB VIEWER. Pengukuran dilakukan dengan metode mikrometer mikroskop dengan *software* IMAGE RASTER dari OPTILAB untuk mengetahui diameter (μm) sel dan nukleus, *circumference* (μm) sel dan nukleus dengan rumus $C = 2 \times \pi \times r$ (r = jari-jari, $\pi = 3,14$), *surface area* (μm^2) sel dan nukleus dengan rumus $S = \pi \times r^2$ (r = jari-jari, $\pi = 3.14$) serta luas sitoplasma (μm^2) sel limfosit dan sel monosit AKB sehat. Selanjutnya, data dianalisis oleh perangkat lunak IBM SPSS versi 22 dengan menggunakan analisis ragam yang disajikan dalam bentuk tabel, gambar, dan grafik.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Nilai *cytomorphometry* sel dan nukleus pada *peripheral blood mononuclear cell* AKB diukur dalam satuan mikrometer (μm) dan dianalisis menggunakan uji statistik manuvariat. Hasil penelitian menunjukkan bahwa ukuran diameter sel limfosit AKB pada kelompok jenis kelamin (jantan dan betina) serta kelompok umur (muda dan dewasa) berada pada kisaran 7,312–8,761 μm (Gambar 1.A). *Cytomorphometry* diameter nukleus limfosit AKB pada penelitian ini (Gambar 1.B) berkisar 5,786–7,138 μm . Hasil pengukuran *circumference* sel limfosit pada kisaran 23,131-27,737 μm dan *circumference* nukleus limfosit pada kisaran 18,160-22,402 μm (Gambar 1.C dan 1.D). Ukuran *surface area* sel limfosit AKB berada pada kisaran 42,318-60,140 μm^2 dan *surface area* nukleus limfosit AKB pada kisaran 27,331-40,308 μm^2 (Gambar 1.E dan 1.F). *Cytomorphometry* luas sitoplasma sel limfosit AKB pada kisaran 8,863-27,509 μm^2 (Gambar 1.G). Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa pada AKB yang sehat, ukuran sel limfosit antara jenis kelamin (jantan dan betina) dan umur (muda dan dewasa) tidak berbeda nyata $P (>0.05)$.



Gambar 1. Grafik hasil analisis *Cytomorphometry* sel limfosit. (A) Diameter nukleus limfosit, (B) diameter sel limfosit, (C) *circumference* nukleus limfosit, (D) *circumference* sel limfosit, (E) *surface area* nukleus limfosit, (F) *surface area* sel limfosit, (G) luas sitoplasma sel limfosit.



Gambar 2. Hasil pengukuran *Cytomorphometry Peripheral Blood Mononuclear Cell* AKB menggunakan *software image raster*. (A) Diameter nukleus limfosit, (B) diameter sel limfosit.

Ukuran diameter sel limfosit AKB dalam penelitian ini masih dalam kisaran hasil penelitian lain pada anjing. Penelitian Samuelson (2007), melaporkan bahwa sel limfosit merupakan jenis leukosit yang tidak bergranula dengan diameter 8–15 μm . Berdasarkan ukuran, limfosit dibedakan atas limfosit kecil dengan diameter 6–9 μm dan limfosit besar dengan diameter 10-15 μm . Terlihat bahwa diameter sel limfosit pada AKB didominasi limfosit berukuran kecil. Hasil penelitian ini juga sejalan dengan penelitian Chaleow *et al.* (2000), yang menemukan bahwa ukuran diameter sel limfosit pada anjing liar di Asia berkisar 7-17 μm . Apabila dibandingkan dengan hewan lainnya ukuran diameter sel limfosit AKB lebih kecil daripada diameter sel limfosit kucing yaitu pada kisaran 8,7-14,5 (Prihirunkit *et al.*, 2007), pada kelinci diameter sel limfositnya berkisar 7-15 μm (Marshall, 2008) dan pada sapi bali di Nusa Penida berkisar 7,096-11,836 μm (Suwiti *et al.*, 2019).

Jika terdapat adanya ukuran yang lebih besar ataupun lebih kecil dibandingkan ukuran normal, dapat menandakan adanya kondisi patologis yang perlu diperhatikan, salah satunya indikasi dari tumor limfoma. Limfoma yaitu istilah yang umum diberikan untuk semua kelainan neoplastik pada jaringan limfoid. Bentuk sel ganas pada sel limfoma adalah sel limfosit yang berada pada salah satu tingkat diferensiasinya baik limfosit T maupun limfosit B, bersifat heterogen dengan spektrum bervariasi. Variasinya tidak saja ditemukan dari histologi ataupun morfologinya saja melainkan juga lokasi primer limfoma. Kasus limfoma pada anjing yaitu limfoma retrobulbar terdapat sub tipe limfoma sel B yang membesar dan banyak terdapat sel T. Sel-sel neoplastik memiliki sedikit sitoplasma dan inti bulat atau berlekuk dengan tingkat mitosis tinggi (Attali-Soussay *et al.*, 2001).

Pada hasil analisis sel monosit menunjukkan bahwa ukuran diameter sel monosit AKB pada kelompok jenis kelamin (betina dan jantan) dibandingkan dengan kelompok umur (muda dan dewasa) berada pada kisaran 7,785-8,883 μm (Gambar 3.A). Ukuran diameter nukleus monosit pada AKB memiliki kisaran 6,099-7,457 μm (Gambar 3.B). Hasil analisis ukuran *circumference* sel monosit (24,514-27,966 μm) dan *circumference* nukleus monosit (19,093-23,442 μm) pada AKB (Gambar 3.C dan 3.D). Hasil analisis ukuran *surface area* menunjukkan bahwa AKB memiliki ukuran *surface area* sel (48,313-62,334 μm^2) dan *surface area* nukleus (28,979-43,736 μm^2) (Gambar 3.E dan 3.F). Ukuran luas sitoplasma sel monosit AKB yang memiliki kisaran 12,230-25,953 μm^2 (Gambar 3.G).

Menurut Brown dan Dellmann (1989), monosit adalah leukosit terbesar dengan diameter 15-20 μm . Data ini merupakan pembeda antara AKB dengan anjing lainnya yaitu ukuran diameter sel monosit pada AKB lebih kecil daripada diameter sel monosit anjing pada umumnya. Apabila dibandingkan dengan hewan lainnya ukuran diameter sel monosit AKB lebih kecil daripada diameter sel limfosit sapi bali di Nusa Penida menurut hasil penelitian (Suwiti *et al.*, 2019) yaitu pada kisaran 8,417-21,621 μm , pada kelinci diameter sel monositnya berkisar 15-18 μm (Marshall, 2008) dan pada kucing memiliki rerata diameter monosit berkisar 13,8 μm (Prihirunkit *et al.*, 2018).

Sel monosit bersifat kurang aktif memfagosit pada aliran darah dibandingkan dengan di jaringan. Selain itu, sel monosit tidak pernah mencapai dewasa penuh sampai bermigrasi ke luar pembuluh darah dan masuk ke dalam jaringan. Kemudian dalam jaringan menjadi makrofag tetap, seperti pada sinusoid hati, sumsum tulang, alveoli paru-paru, dan jaringan limfoid. Sel monosit sering berperan dalam infeksi kronis (Brown dan Dellman, 1989).

Perbedaan ukuran sel dengan nukleus pada PBMC AKB dapat disebabkan oleh perbedaan dalam kondisi fisiologis, anjing telah memasuki masa dewasa dan mencapai kematangan seksual pada umur di atas 12 bulan, dan karena perubahan lingkungan, habitat serta status nutrisi pada anjing.

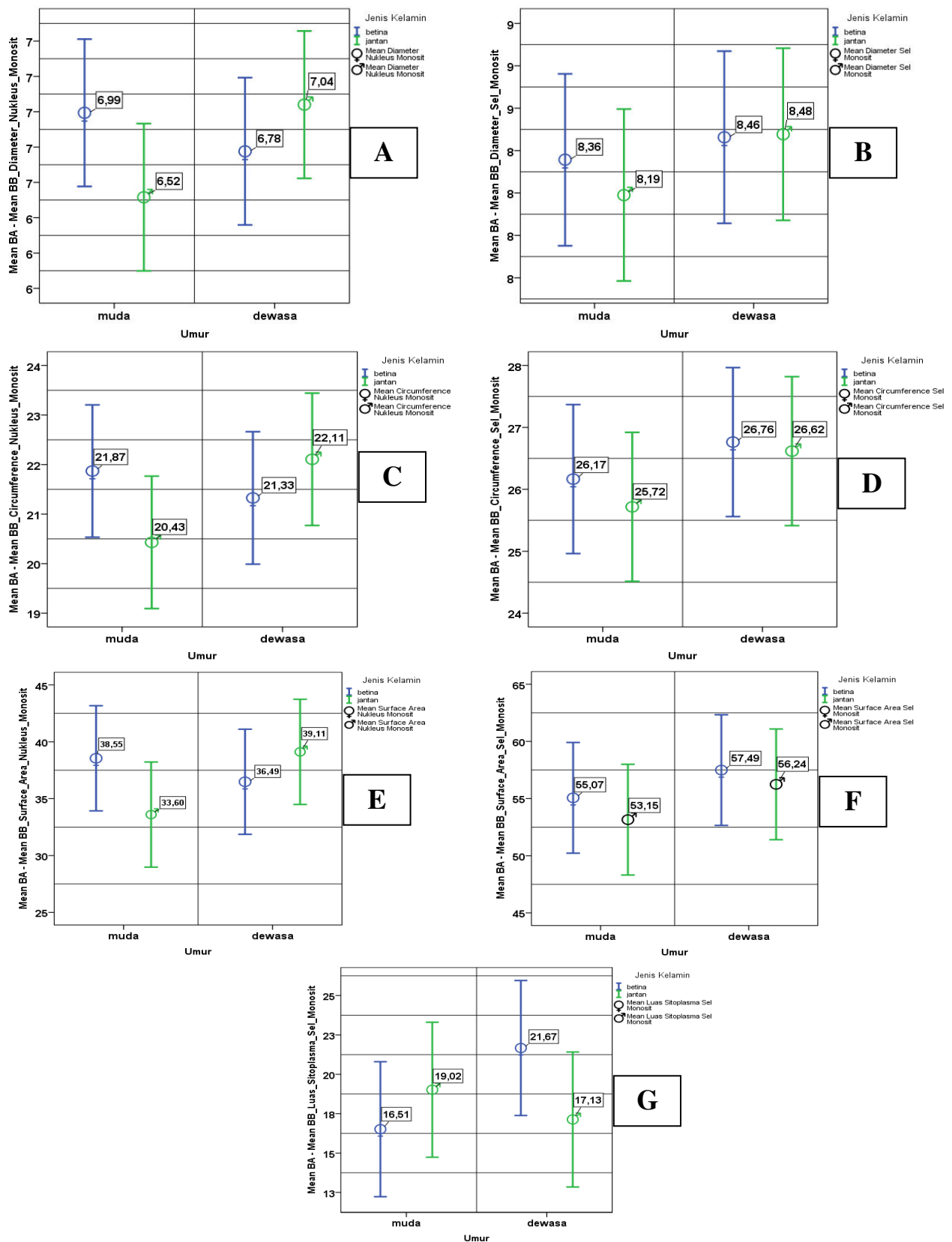
Anjing yang diambil datanya merupakan anjing sehat dengan hasil yang didapatkan yaitu ukuran sel limfosit dan monosit AKB bila dibandingkan dengan literatur yang ada menunjukkan nilai ukuran *cytomorphometry* yang cenderung lebih rendah. Adanya variasi pada ukuran diameter sel dan nukleus, *circumference* sel dan nukleus, *surface area* sel dan nukleus, dan luas sitoplasma pada sel limfosit dan monosit AKB dapat disebabkan oleh kondisi fisiologis masing-masing anjing. Kondisi fisiologis pada hewan dapat dipengaruhi

oleh beberapa faktor seperti temperatur lingkungan, kualitas nutrisi pakan, keseimbangan cairan tubuh, dan *breed* (Ciaramella *et al.*, 2005).

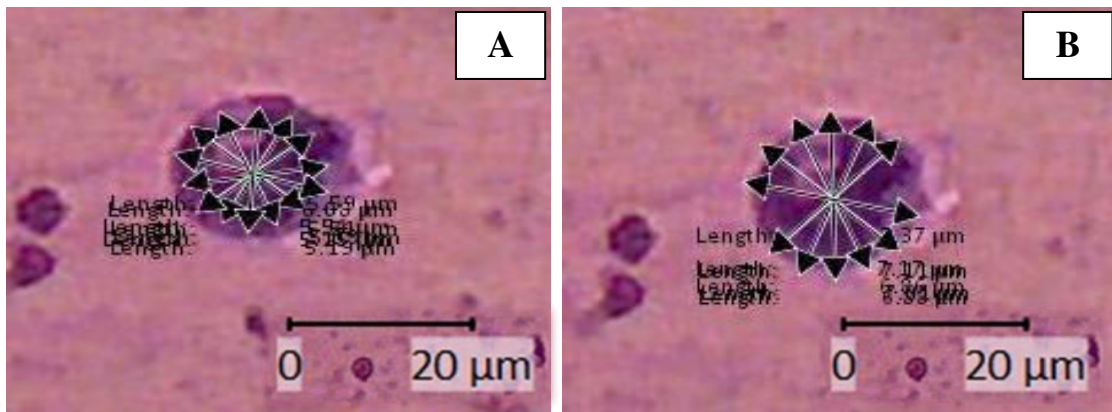
Ketika temperatur lingkungan terlalu tinggi maka dapat menyebabkan *heat stress*. Stres dapat meningkatkan sekresi kortikosteroid dari kelenjar adrenal yang menyebabkan atrofi organ limfoid sehingga menekan jumlah limfosit. Karena adanya keterkaitan yang kuat antara pelepasan glukokortikoid dan pembentukan sel-sel leukosit terutama limfosit. Selain itu, pada kondisi lingkungan yang panas terjadi penurunan sekresi hormon tiroid, hormon tiroid berperan dalam pengaturan metabolisme tubuh. Penurunan hormon tiroid menyebabkan laju metabolisme juga menurun hingga nilai terendah di musim panas (Marai dan Haebe, 2010).

Cairan tubuh digolongkan menjadi dua yaitu cairan intra seluler (CIS) dan di cairan ekstra seluler (CES). Cairan ini merupakan medium tempat sel hidup. Sel menerima garam, makanan serta oksigen dan melepaskan semua hasil buangan ke dalam cairan itu juga. Sherwood (2013) menyatakan keseimbangan cairan menjadi penting karena merupakan bagian dari kontrol tubuh untuk mempertahankan homeostatis, sehingga tubuh harus mengatur agar *input* cairan sama dengan *output* cairan (*balance concept*). Jadi, ketika cairan tubuh ini tidak seimbang maka pertumbuhan sel akan terganggu.

Jika dilihat berdasarkan *breed*, ukuran diameter sel darah pada anjing kintamani relatif lebih kecil daripada ras anjing lainnya. Hasil ini didukung oleh beberapa data tentang anjing grup V, kelompok yang sama dengan AKB memiliki ukuran diameter sel darah merah yang telah dilaporkan pada anjing ras dari Jepang (akita dan shiba) lebih kecil dibanding anjing lainnya (Meinkoth, 2010). Kemudian menurut hasil penelitian Adili *et al.*, (2016) yang mengatakan bahwa ukuran diameter sel darah merah pada anjing soulghi berada pada kisaran 6,30-7,77 μm dan *German Shepherd* pada kisaran 6,29-7,42 μm . Anjing kintamani bali lebih kecil yaitu pada kisaran 4,647-5,479 μm . Terlihat bahwa rerata dan rentangan ukuran sel limfosit AKB betina baik umur muda maupun dewasa lebih besar di bandingkan dengan ukuran sel limfosit AKB jantan umur muda dan jantan umur dewasa. Hal ini dikarenakan AKB betina memerlukan kompensasi lebih banyak darah pada saat menstruasi dan *post-partum* (Adili *et al.*, 2016).



Gambar 3. Grafik hasil analisis *cytomorphometry* sel limfosit. (A) Diameter nukleus monosit, (B) diameter sel monosit, (C) *circumference* nukleus monosit, (D) *circumference* sel monosit, (E) *surface area* nukleus monosit, (F) *surface area* sel monosit, (G) luas sitoplasma sel monosit.



Gambar 4. Hasil pengukuran *Cytomorphometry Peripheral Blood Mononuclear Cell* AKB menggunakan *software image raster*. (A) Diameter nukleus monosit, (B) diameter sel monosit.

SIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian ini, maka dapat disimpulkan yaitu *cytomorphometry* sel limfosit AKB memiliki diameter 7,312-8,761 μm , *circumference* 23,131-27,737 μm , *surface area* 42,318-60,140 μm^2 dan luas sitoplasma 8,863-27,509 μm^2 sementara nukleus limfosit memiliki diameter 5,786-7,138 μm , *circumference* 18,160-22,402 μm , *surface* 27,331-40,308 μm^2 . *Cytomorphometry* sel monosit AKB memiliki diameter 7,785-8,883 μm , *circumference* 24,514-27,966 μm , *surface area* 48,318-62,334 μm^2 dan luas sitoplasma 12,230-25,953 μm^2 . Sementara nukleus monosit AKB memiliki diameter nukleus 6,099-7,457 μm , *circumference* 19,093-23,442 μm , *surface area* 28,979-43,736 μm^2 . Nilai *cytomorphometry* AKB tidak berbeda nyata ($P>0,05$) antara betina muda dengan betina dewasa serta antara jantan muda dengan jantan dewasa.

SARAN

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai *cytomorphometry peripheral blood mononuclear cell* AKB dengan hubungannya pada penyakit klinis serta penelitian mengenai *cytomorphometry peripheral blood mononuclear cell* AKB sakit sehingga mengetahui perbedaan antara *cytomorphometry peripheral blood mononuclear* AKB sakit dan sehat.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terimakasih kepada warga Desa Sukawana, Dinas Peternakan Perikanan Darat Kabupaten Bangli, Dinas Pertanian Ketahanan Pangan dan Perikanan, dan Balai Besar Veteriner (BBVET) Denpasar dalam memfasilitasi penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Adili N, Melizil M, Belabbas H, Bala A, Merad S, Bouali F, Bennoune O. 2016. Morphometric study of red blood cells in sloughi and german shepherd dogs. *Bulgarian Journal of Veterinary Medicine* 20(2): 125-130.
- Ananya B, Kumar MP, Kumar MB. 2014. Morphometrical Analysis of Blood Cells of Japanese Quail (*Coturnix coturnix japonica*) in two different Age Groups. *International Research Journal of Biological Sciences* 3(9): 38-41.
- Attali-Soussay K, Jegou JP, Clerc B. 2001. Retrobulbar tumors in dogs and cats: 25 cases. *Veterinary Ophthalmology* 1(4): 19-27.
- Brown EM, Dellman HD. 1989. *Veterinary Histology*. 3th ed. Hartono R. (Ed) Jakarta: UI-Press.
- Chaleow S, Jarernsak S, Jutamat R, Narit T, Wanchai T, Suntaree A. 2000. Morphology and Cytochemistry of Blood Cells from Asian Wild Dog (*Cuon alpinus*). *Nat. Sci.* 34: 518-525.
- Ciaramella P, Corona M, Ambrosio R, Consalvo F, Persechino A. 2005. Hematological profile on non-lactating mediterranean buffaloes (*Bubalus bubalis*) ranging in age from 24 months to 14 years. *Veterinary Science* 79: 77-80.
- Jalal P, Salimi A. 2015. Isolated Human Peripheral Blood Mononuclear Cell (PBMC), a Cost Effective Tool for Predicting Immunosuppressive Effects of Drugs and Xenobiotics. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research* 14 (4): 679-980.
- Maiolino P, Restucci B, Papparella S, De Vico G. 2002. Nuclear Morphometry In Squamous Cell Carcinomas Of Canine Skin. *Journal Comparative Pathology* 127: 114-117.
- Marai IFM, Haebe AAM. 2010. Buffalo's biological functions as affected by heat stress. *Journal Livestock Science* 127: 89-109.
- Marshall KL. 2008. Rabbit hematology. *Exotic Animal Practice* 11(3): 551-567.
- Meinkoth JH, Rizzi TE, Clinkenbeard KD. 2010. Normal Hematology of The Dog. In Weiss DJ, Wordrop KJ. (Ed) Schalm's *Veterinary Hematology*. 6th ed. USA: Wiley-Blackwell Publishing. 799-810.
- Prihirunkit K, Salakij C, Apibal S, Narkkong NA. 2007. Hematology cytochemistry and ultrastructure of blood cells in fishing cat (*Felis viverrina*). *J. Vet. Sci* 8(2): 163-168.
- Puja IK, Gunawan IWNF, Sukada IM. 2012. Perilaku bermasalah pada anjing kintamani. *Buletin veeriner* 4(2): 95-100.
- Rahayu NLSS, Suwiti NK, Suastika P. 2016. Struktur histology dan histomorfometri granulosit pada sapi bali pasca pemberian mineral. *Buletin veteriner* 8(2): 151-158.
- Sakuma A, Ohtani S, Saitoh H, Iwase H. 2012. Comparative Analysis of Aspartic Acid Racemization Methods using Whole-tooth and Dentin Samples. *Forensic Science International*. 216: 88-91.
- Samuelson DA. 2007. *Textbook of Veterinary Histology*. China: Saunders and Elsevier.
- Sherwood L. 2013. *Human Physiology from Cell to System*. 8th ed. Belmont: Books/Cole-Thomson Learning.

- Suwanachat P, Jangsangthong A, Jaykum P, Buamas S, Kaewkongjan W, Buranasinsup S. 2012. Effect of sex, age and strain on hematological and blood clinical chemistry in healthy canin. *Journal of Applied Animal Science* 5(3): 25-38.
- Suwiti NK, Adinugroho MO, Suastika P. 2019. Histomorfometri sel darah putih agranulosit bibit sapi bali di nusa penida. *Buletin veteriner* 11(1): 33-38.
- Warnasih S, Yulia W, Yohan B, Artika IM, Sasmono RT. 2016. Isolasi peripheral blood mononuclear cells (PBMCS) dari darah manusia sehat dengan metode sentrifugasi gradien ficoll. *Ekologia* 16(1): 19-23.