



KUMPULAN MAKALAH SEMILOKA MUTU 2017

**Standardization in Hematology:
Pursuing Quality of Hematology Assay**



**BADAN KHUSUS PKEL
PDS PATOLOGI KLINIK & KEDOKTERAN
LABORATORIUM INDONESIA**



KUMPULAN MAKALAH SEMILOKA MUTU 2017

**Standardization in Hematology:
Pursuing Quality of Hematology Assay**

Editor:

dr. Lidya Utami, SpPK(K)

dr. Lyana Setiawan, SpPK

Kumpulan Makalah Semiloka Mutu 2017

Standardization in Hematology: Pursuing Quality of Hematology Assay

Editor: Lidya Utami, Lyana Setiawan

ISBN No. 978-979-98930-5-5

Copyright 2017

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

Dilarang memperbanyak, mencetak, dan menerbitkan sebagian atau seluruh isi buku ini dengan cara dan dalam bentuk apapun juga tanpa seizin penulis dan penerbit

Diterbitkan pertama kali oleh

Badan Khusus PKEL

PDS Patologi Klinik dan Kedokteran Laboratorium Indonesia

Jakarta, April 2017

DAFTAR ISI

Kata Sambutan Ketua Umum PDS PatKLI

Daftar kontributor

Daftar isi

| | |
|--|-----|
| Challenges for Clinical Pathologists in A Fast Development of Laboratory Technology Ida Parwati | 1 |
| Development and Application Of Standardization In Laboratory Medicine Howard A. Morris | 7 |
| Pre Analytical Aspect in Hematology Test and The Impact For Patient Safety Delita Prihatni | 13 |
| Performance Verification of Hematology Analyzer Maimun Zulhaidah Arthamin, Dwi Priyadi Djatmiko | 18 |
| Optimizing The Role of Flowcytometry in Hematologic Malignancy Yetti Hernaningsih | 30 |
| Metode dan Interferensi Alat Hitung Sel Darah Otomatik Fify Henrika | 42 |
| Review Criteria of Hematology Result: Application Of ICSH Guideline Mansyur Arif | 50 |
| Peran Parameter Retikulosit Tambahan pada Tata Laksana Penyakit Ginjal Kronik Riadi Wirawan, Ailinda Theodora Tedja | 59 |
| Extended Platelet Parameter Usi Sukorini | 67 |
| Skrining dan Alur Diagnosa Hemoglobinopati Riadi Wirawan | 79 |
| Strategy for High Quality Smear Lidya Utami | 87 |
| Standardization of Peripheral Blood Morphology Evaluation Imam Budiwiyono..... | 94 |
| Pemeriksaan Aspirasi Sumsum Tulang (BMP) Berdasarkan International Council for Standardization in Haematology (ICSH) Adi Koesoema Aman, Jane Silitonga | 103 |

OPTIMIZING THE ROLE OF FLOWCYTOMETRY IN HEMATOLOGY MALIGNANCY

Yeti Hernaningsih

Departemen/SMF Patologi Klinik FK Universitas Airlangga
/RSUD Dr. Sutomo Surabaya

ABSTRAK

Pemeriksaan keganasan hematologi telah mengalami kemajuan hingga saat ini baik dari sisi diagnostik maupun monitoring terapi dan prediksi prognosis. Salah satu metode yang digunakan adalah flowsitometri. Kegunaan flowsitometri dalam keganasan diagnosis antara lain untuk menentukan diagnosis tipe dan subtype leukemia akut, untuk menentukan *minimal residual disease* (MRD), pemantauan CD34+ *stem cell* pada pasien yang mendapatkan terapi transplantasi sumsum tulang, pemeriksaan apoptosis, siklus sel dan DNA indeks baik untuk kepentingan penatalaksanaan pasien maupun pengembangan riset.

Kata kunci: *flowsitometri, keganasan hematologi*

PENDAHULUAN

Alat flowsitometri mempunyai prinsip deteksi panjang gelombang dari sinar yang dipancarkan oleh suatu sel yang diperiksa, setelah diberikan pewarnaan ataupun fluorokrom tertentu dan diberikan sinar laser tertentu, yang selanjutnya pancaran sinar tersebut akan ditangkap oleh sistem fotodetektor pada panjang gelombang yang sesuai.¹ Pada bidang hematologi, alat ini mempunyai banyak manfaat untuk mendeteksi suatu sel berdasarkan : 1) ekspresi antigen tertentu dengan prinsip ikatan antigen-antibodi berlabel, misalnya marka CD tertentu untuk membedakan seri sel limfoid T dan B, myeloid, sel NK, pemeriksaan antibodi untuk mendeteksi protein pro dan anti apoptosis seperti anti-caspase, anti bcl-2, anti PARP, anti survivin, anti hsp, dan masih banyak lagi. 2) mendeteksi berdasarkan pewarnaan tertentu pada suatu sel seperti PI, DAPI, 7-AAD yang digunakan untuk membedakan antara sel hidup dan mati. Deteksi ini meliputi antigen yang ada pada permukaan maupun intrasel dengan melalui tahapan perlakuan khusus pada pengecatan. Berikut ini perkembangan pemeriksaan di bidang keganasan hematologi yang dapat dikerjakan pada alat flowsitometri.

IDENTIFIKASI KEGANASAN HEMATOLOGI

Identifikasi keganasan hematologi meliputi penentuan tipe dan subtype leukemia tertentu. Tipe keganasan yang telah terbukti jelas dapat dibedakan dengan imunofenotipe ini

adalah sel blast yang berasal dari myeloid atau limfoid. Lebih jauh lagi sub tipe myeloid, limfoid B dan T dapat dibedakan berdasarkan ekspresi antigen terkait maturasinya seperti pada kriteria SJRH atau EGIL (tabel 1).³ Tipe akut dan kronik dibedakan berdasarkan ekspresi marka CD petanda prekursor sel seperti CD34 dan HLA-DR pada seri myeloid.

Tidak ada satu jenis antibodi monoklonal yang spesifik untuk menentukan *lineage* tertentu, oleh karenanya diperlukan kombinasi antibodi. Kombinasi antibodi ini dapat menentukan pula sampai di tahap mana diferensiasi sel terhenti atau *maturation arrest* terjadi seperti pada penentuan sub tipe ALL dan AML karena pada hakekatnya setiap molekul CD mempunyai karakteristik, ada yang diekspresikan sepanjang tahap perkembangan, tetapi ada pula yang mempunyai masa tertentu. Meskipun pada umumnya terdapat karakteristik lineage tertentu dari suatu marka CD, namun terkadang masih dijumpai marka CD tertentu yang ditemukan pada bukan lineage yang seharusnya, yang disebut ekspresi menyimpang (*aberrant expression*).³ Ada jenis leukemia yang populasi sel blast nya terdiri dari 2 populasi yang berbeda, yang dikenal dengan *biphenotypic acute leukemia* (BAL) atau *mixed phenotype acute leukemia* (MPAL). Tabel 2, 3 dan 4 merupakan strategi untuk menentukan apakah sel tersebut pada suatu *lineage* mempunyai marka CD *aberrant* atau apakah populasi sel blast merupakan bifenotipe berdasarkan SJRH dan EGIL serta penggolongan MPAL berdasarkan WHO.

Tabel 1. Klasifikasi imunologi leukemia akut berdasarkan SJRH dan EGIL.³

| SJRH classification (21) | | EGIL classification (90) | |
|---|--|---|--|
| Immunologic subgroup | Immunophenotypic profile | Immunologic subgroup | Immunophenotypic profile |
| B-lineage ALL Early pre-B | CD19+/CD22+/cyCD3-/MPO- CD79α±/CD10+/Igμ- | B-lineage ALL B-I (pro-B) B-II (common B) B-III (pre-B) | CD19+ and/or CD79α+ and/or CD22+ No B-cell differentiation antigens CD10+ cyIgμ+ |
| Pre-B ALL Transitional (late) pre-B Mature B | CD79α+/CD10+/cyIgμ+ CD79α+/CD10+/cyIgμ+/sIgμ+ CD79α+/CD10±/cyIgμ±/sIgμ±/sIgλ+ or sIgκ+ | B-IV (mature B) | cyIg or sIg κ+ or λ+ |
| T-lineage ALL Pre-T Early-T Common-T Late-T | CD7+/cyCD3+/CD22-/CD79a±/MPO- sCD3-/CD5-/CD1-/CD4-/CD8-/CD10- sCD3-/CD5+/CD1-/CD4-/CD8±/CD10- sCD3 ^{lo} /CD5+/CD1±/CD4±/CD8±/CD10± sCD3 ^{hi} /CD5+/CD1-/CD4+ or CD8+/CD10- | T-lineage ALL T-I (pro-T) T-II (pre-T) T-III (cortical T) T-IV (mature T) α/β (group a) γ/δ (group b) | Cytoplasmic/surface CD3+ CD7+ CD2+ and/or CD5+ and/or CD8+ CD1a+ Surface CD3+, CD1a- TCR α/β+ TCR γ/δ+ |
| Early myeloid (AML-M0) | Anti-MPO± but enzymatic MPO-/CD33±/ CD13±/CD15±/CD117±/CD61-/GPA- | Early myeloid (AML-M0) | MPO± but enzymatic MPO-/CD13+/CD33+/ CD65+/and-or CD117+ |
| Myeloid lineage | CD34±/HLA-DR±/MPO±/CD33±/CD13±/ CD15±/CD64- or wk/CD117±/CD61-/GPA- | Myelo/monocytic lineage | MPO+/CD13+/CD33+/CD65+/and-or CD117+ |
| Monocytic lineage | CD34-/HLA-DR±/MPO±/CD33±/CD13±/ CD14±/CD15±/CD64+/CD117±/CD61-/GPA- | | |
| Megakaryocytic lineage | CD34±/HLA-DR±/MPO-/CD33±/CD13±/ CD15±/CD64-/CD117±/CD61+/GPA- | Megakaryocytic lineage | CD41+ and/or CD61+ (surface or cytoplasmic) |
| Erythroid (pure) lineage | CD34±/HLA-DR±/MPO-/CD33±/CD13±/ CD15±/CD64-/CD117±/CD61-/GPA- | Erythroid lineage | Early/immature: unclassified by markers Late/mature: GPA+ |
| Undifferentiated | CD45+/CD34±/CD19±/CD22-/CD79α-/ cyCD3-/CD7±/CD5-/MPO-/CD33±/ CD13-/CD15-/CD117±/CD61-/GPA- | Undifferentiated | Often CD34±/HLA-DR±/CD38±/CD7+ |

Abbreviations: SJRH, St. Jude Children's Research Hospital; EGIL, European Group for the Immunological Characterization of Leukemia; MPO, myeloperoxidase; cyIg, cytoplasmic immunoglobulin; sIg, surface immunoglobulin; TCR, T-cell receptor.

Tabel 2. Penentuan ekspresi CD aberrant dan biphenotypic acute leukemia berdasarkan SJCRH.³

| SJCRH Criteria for My+ ALL, Ly+ AML, and Biphenotypic Leukemia | |
|---|--|
| Ly+ AML^a | B-lineage My+ALL^a |
| 1. Leukemic blasts are MPO ^b (or ANB+ if AML M5) | 1. Leukemic blasts are CD19+ plus CD22+ or cyCD79α+ or cyIg μ+ |
| 2. Leukemic blasts are cyCD3- | 2. Leukemic blasts are cyCD3- |
| 3. Leukemic blasts are cyIgμ- and do not coexpress CD22 plus cyCD79α- | 3. Leukemic blasts are MPO ^{-b} |
| 4. Leukemic blasts express ≥1 lymphoid-associated antigens: CD2, CD5, CD7, CD19, CD22, CD56, cyCD79α | 4. Leukemic blasts express ≥1 myeloid-associated antigens: CD13, CD14, CD15, CD33, CD36, or CD65 |
| Biphenotypic acute leukemia | T-lineage My+ ALL^a |
| Myeloid/B-lineage biphenotypic acute leukemia: Leukemic blasts coexpress MPO ^b and cyIgμ, or MPO ^b and cyCD79α plus CD22 | 1. Leukemic blasts are CD7+ and cyCD3+ |
| Myeloid/T-lineage biphenotypic acute leukemia: Leukemic blasts coexpress MPO ^b plus cyCD3 | 2. Leukemic blasts are CD22- |
| Mixed B- and T-lineage acute leukemia: Leukemic blasts coexpress cyCD3 plus cyIgμ, or cyCD3 and cyCD79α plus CD22 | 3. Leukemic blasts are MPO ^{-b} |
| | 4. Leukemic blasts express ≥1 myeloid-associated antigens: CD13, CD14, CD15, CD33, CD36, CD65, CD79α ^{wk} |
| <p><i>Abbreviations:</i> SJCRH, St. Jude Children's Research Hospital; Ly+ AML, acute myeloid leukemia expressing lymphoid (Ly)-associated antigens; My+ ALL, acute lymphoid leukemia expressing myeloid (My)-associated antigens; MPO, myeloperoxidase; ANB, α-naphthyl butyrate esterase; cyCD, cytoplasmic antigen expression; wk, weak.</p> <p>^aAll four criteria must be fulfilled.</p> <p>^bConfirmed by cytochemical, anti-MPO, or ultrastructural study.</p> | |

Tabel 3. Penggolongan biphenotypic acute leukemia berdasarkan sistem skoring dari EGIL.³

| EGIL Immunophenotyping Criteria (Scoring System) for Biphenotypic Acute Leukemias | | | |
|---|-----------|---------|---------------------|
| B-lineage | T-lineage | Myeloid | Points ^a |
| CD79α | cy/s CD3 | MPO | 2 |
| CyIgμ | TCRα/β | | |
| cy/sCD22 | TCRγ/δ | | |
| CD19 | CD2 | CD13 | 1 |
| CD10 | CD5 | CD33 | |
| CD20 | CD8 | CD65s | |
| | CD10 | CD117 | |
| TdT | TdT | CD14 | 0.5 |
| CD24 | CD7 | CD15 | |
| | CD1a | CD64 | |
| <p><i>Abbreviations:</i> EGIL, European Group for the Immunological Characterization of Leukemia; cy, cytoplasmic; s, surface; TCR, T-cell receptor; MPO, myeloperoxidase; TdT, terminal deoxynucleotidyl transferase.</p> <p>^aBiphenotypic acute leukemia is defined by >2 points from the myeloid group and >2 points from the B-lineage or T-lineage group.</p> <p>Data from ref. 90.</p> | | | |

Tabel 4. Penentuan *mixed phenotype acute leukemia* (MPAL) berdasarkan WHO.⁴

| Lineage assignment criteria |
|--|
| Myeloid lineage MPO* (flow cytometry, immunohistochemistry, or cytochemistry) or Monocytic differentiation (at least 2 of the following: nonspecific esterase cytochemistry, CD11c, CD14, CD64, lysozyme) |
| T-lineage Strong† cytoplasmic CD3 (with antibodies to CD3 ϵ chain) or Surface CD3 |
| B-lineage Strong† CD19 with at least 1 of the following strongly expressed: CD79a, cytoplasmic CD22, or CD10 or Weak CD19 with at least 2 of the following strongly expressed: CD79a, cytoplasmic CD22, or CD10 |
| *See "Acute leukemias of ambiguous lineage" for caveats related to weaker antigen expression, or to expression by immunohistochemistry only. †Strong defined as equal or brighter than the normal B or T cells in the sample. |

Berdasarkan intensitas fluoresens yang dihasilkan oleh suatu fluorokrom, suatu ekspresi dibagi menjadi 3 yaitu intensitas yaitu *dim*, *moderate* dan *strong*. *Dim* bila intensitasnya jatuh pada $\log 10^2$, *moderate* bila jatuh pada $\log 10^3$ dan *strong* bila pada $\log 10^4$ pada skala logaritmik dari sumbu X hasil flowsitometri.⁵

DETEKSI MINIMAL RESIDUAL DISEASE (MRD)

Terapi pada leukemia akut bertujuan untuk mencapai remisi lengkap. Pada kenyataannya pasien yang nampaknya sudah mencapai remisi lengkap menurut hapusan sumsum tulang, bisa terjadi relaps kembali dalam waktu dekat. Hal ini disebabkan masih terdapatnya klon leukemia yang tidak terdeteksi saat pemeriksaan evaluasi sumsum tulang. Oleh karenanya sangat diperlukan pemeriksaan sisa sel klonal leukemia atau yang lebih dikenal pemeriksaan *minimal residual disease*. Pemeriksaan ini salah satunya adalah dengan pemeriksaan CD marker tertentu pada flowsitometri.

Deteksi MRD pada leukemia berdasarkan ekspresi *aberrant* pada sel ganas sesuai saat diagnosis. *Aberrant* ini dikenal sebagai *leukemia associated (immuno)phenotypes (LAIPs)*, yang tidak atau sangat jarang ditemukan pada sel darah sumsum tulang normal. Gambaran LAIPs biasanya berbeda dengan saat diagnosis, tetapi pada umumnya beberapa atau semua *aberrant* yang ditemukan saat diagnosis masih terdeteksi juga pada saat relaps.⁶

LAIPs pada leukemia myelogenous akut (LMA) terdiri dari ekspresi *aberrant*, biasanya dikombinasikan dengan petanda myeloid (CD13, CD33) dan dengan antigen

normal progenitor seperti CD34, CD117 atau CD133. Beberapa monoklonal antibodi yang dapat digunakan untuk menentukan LAIPs pada pasien LMA antara lain: 1) *cross-lineage* ekspresi antigen (terekspresinya petanda limfoid seperti CD2, CD3, CD5, CD7, CD10 dan CD19 pada myeloblast, 2) asinkronisasi ekspresi antigen (co-ekspresi antigen yang tidak sesuai dengan tahapan maturasinya, misalnya ekspresi CD34 pada tahap myeloblast disertai CD15 yang seharusnya baru muncul pada tahap akhir maturasi sel, 3) tidak terekspresinya antigen *lineage* spesifik seperti CD13 dan CD33 yang spesifik untuk sel myeloid, 4) over ekspresi suatu marka CD tertentu.⁸ Tabel 5 menunjukkan ekspresi *aberrant* yang umum terjadi pada LAIPs leukemia akut.

Tabel 5. Kombinasi imunofenotipe yang digunakan untuk menentukan MRD pasien leukemia akut.⁷

| Disease | Phenotype | Frequency (%) [†] | Frequency in Normal BM (% positive cells \pm SD) [‡] |
|----------------|-------------------------------|----------------------------|---|
| B-lineage ALL* | TdT-CD10 (or CD19-CD34)/CD13 | 7 | 0.02 \pm 0.01 |
| | TdT-CD10 (or CD19-CD34)/CD33 | 8 | 0.03 \pm 0.02 |
| | TdT-CD10 (or CD19-CD34)/CDw65 | 7 | 0.02 \pm 0.01 |
| | TdT-CD10 (or CD19-CD34)/CD21 | 10 | 0.02 \pm 0.01 |
| | TdT-CD10 (or CD19-CD34)/CD56 | 9 | <0.01 |
| | TdT/cytoplasmic μ /CD34 | 14 | 0.03 \pm 0.01 |
| T-ALL | TdT/cytoplasmic CD3 | 90 | <0.01 |
| AML | CD34/CD56 | 20 | <0.01 |
| | CDw65/CD34/TdT | 15 | <0.01 |

* Approximately 35% of cases have at least one leukemia-associated phenotype.
[†] Greater than 10% positive leukemic lymphoblasts.
[‡] ALL- and AML-phenotypes were studied using light-scattering gates typical of immature lymphoid and myeloid cells, respectively. The reduced level of expression of these phenotypes by normal cells makes it possible to distinguish 1 leukemic cell among 10,000 normal BM cells by relying on such antigens in MRD assays.

PEMERIKSAAN CD34+ STEM CELLS

Terapi transplantasi sumsum tulang pada pengobatan keganasan hematologi sejauh ini semakin berkembang. Hal ini menyebabkan dibutuhkannya pemeriksaan CD34+ pasien, baik saat awal, pre dan post mobilisasi, saat apheresis ataupun monitoring setelah re-infus *stem cell*.

Pemeriksaan *stem cell* yang dikembangkan merupakan protokol dari Suitherland dan Keeny yang kemudian digabungkan dengan panduan klinik dari *International Society for Hematotherapy & Graft Engineering* (ISHAGE). Panel antibodi yang digunakan adalah CD45/CD34/7-AAD. Sel progenitor hematopoietik diidentifikasi dengan kriteria sebagai berikut: 1) mengekspresikan antigen CD34, 2) mengekspresikan antigen CD45 dengan karakteristik intensitas pengecatan sesuai sel blast (tetapi terdeteksi pada intensitas yang lebih rendah daripada limfosit dan monosit), 3) menunjukkan ukuran dan granularitas sesuai dengan limfosit dan sel blast, 4) 7-AAD negatif sehingga sel terbukti hidup.⁹

PEMERIKSAAN APOPTOSIS

Pemeriksaan apoptosis menggunakan flowsitometri dapat menggunakan beberapa prinsip antara lain deteksi dengan fosfatidilserin yang terekspos keluar pada proses apoptosis dengan menggunakan annexin V, dengan pewarnaan untuk memisahkan sel yang hidup dan mati seperti zat warna PI, DAPI dan 7-AAD. Cara lain adalah dengan pemeriksaan antibodi terhadap protein pro apoptosis (bcl-2, bcl-xl, bcl-w, Mcl-1) dan anti apoptosis (Bax, Bak, Bcl-xs, Bok, Bad, Bik, Bid, Bim, Noxa, puma), antibodi terhadap enzim atau produk yang dihasilkan selama dan akhir apoptosis seperti anti-caspase, anti-PARP dan anti-H2Ax.

4.1 Annexin V/PI

Perubahan seluler dapat diukur dengan flowsitometri. Apoptosis diawali dengan pengerutan sel, diekspresikan berupa perubahan pencaran sinar dari sel. Awalnya integritas membran sel tetap utuh. Aktivasi kaspase menyebabkan perubahan potensial membran mitokondria, disertai pergeseran Ca^{+} dan pH intrasel. Setelah hilangnya potensial membran mitokondria, pompa membran lisosom kehilangan fungsinya. Setelah melewati tahap ini, endonuklease endogen diaktivasi, yang dicerminkan oleh redistribusi fosfatidilserin. Akhirnya, sel mengalami disintegrasi menjadi *apoptotic bodies*.¹⁰

4.2 Pemeriksaan Caspase

Peran caspase pada proses apoptosis telah banyak terbukti. Caspase (*cysteine-aspartic proteases*) merupakan keluarga enzim protease sistein yang berada dalam keadaan inaktif atau zimogen di dalam darah. Protein ini akan teraktivasi ketika terdapat inisiasi apoptosis. Diawali dengan aktivasi caspase 8 dan 10 dan selanjutnya akan mengaktifkan caspase lain hingga caspase efektor seperti caspase 3 dan 6 yang. Akibatnya terjadi inaktivasi enzim yang terlibat dalam perbaikan DNA, pemecahan struktur protein inti sehingga terjadi kondensasi protein dan fragmentasi inti, serta fragmentasi DNA menjadi unit nukleosomal.¹¹ Antibodi yang dipakai secara spesifik mengenali bentuk aktif caspase, bukan bentuk proenzim. Antibodi yang tersedia untuk pemeriksaan flowsitometri saat ini yaitu anti caspase-3 aktif.

4.3 Pemeriksaan PARP/H2AX

Poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) sebenarnya merupakan enzim yang memiliki fungsi untuk perbaikan DNA yang rusak akibat bahan mutagen. Enzim ini pada akhir proses apoptosis dipecah oleh caspase-3 menjadi 2 fragmen spesifik yaitu fragmen 89 kDa dan 24 kDa yang dapat diukur pada flowsitometri.¹²

H2AX merupakan salah satu dari kelompok histon yang membentuk kerangka DNA. Pada kerusakan DNA yang berpotensi terjadinya mutasi, sel akan mengaktifkan sekelompok enzim antara lain *ataxia teleangiectasia mutated* (ATM) pada kerusakan *double stranded breaks* dan *ataxia teleangiectasia and Rad3-related* (ATR-3) pada *single stranded breaks*. Sekelompok enzim ini menyebabkan fosforilasi H2AX menjadi γ H2AX. Fosforilasi H2AX menyebabkan sel bergerak menuju apoptosis.¹²

PEMERIKSAAN PROLIFERASI SEL DAN DNA PLOIDI

Terdapat 4 prosedur yang digunakan secara luas untuk menganalisis siklus sel dengan flowsitometri, yaitu prosedur pertama mendeteksi *5-bromo-2'-deoxyuridine* (BrdU) yang bergabung dengan sel yang sedang mengalami replikasi DNA. Pendekatan kedua berdasarkan analisis bivariat kandungan DNA dan protein yang berkaitan dengan proliferasi, yaitu *cyclin*. Ekspresi *cyclin D*, *cyclin E*, *cyclin A* atau *cyclin B1* terhadap kandungan DNA ditunjukkan pada contoh gambar 3. Pendekatan ini dapat membedakan sel G0 dari G1, mengidentifikasi sel mitosis atau ekspresi terkait protein intraseluler lainnya terhadap posisi siklus sel. Prosedur ketiga dan keempat berdasarkan analisis kandungan DNA sel setelah pengecatan sel dengan *propidium iodide* (PI) atau *4',6'-diamidino-2-phenylindole* (DAPI). Pendekatan ini memberikan distribusi sel pada 3 fase utama siklus sel (G1, S, G2/M) dan membuatnya memungkinkan mendeteksi sel apoptosis melalui kandungan DNA yang pecah.¹³

5.1 Metode *bromodeoxyuridine/propidium iodide*

Bromodeoxyuridine (*5-bromo-2'-deoxyuridine*, BrdU) merupakan nukleosida analog timidin, umumnya digunakan untuk mendeteksi proliferasi sel pada jaringan hidup. Substansi ini dapat masuk menyatu dengan DNA yang baru disintesis pada replikasi sel selama fase S, menggantikan posisi timidin selama replikasi DNA. Antibodi spesifik terhadap BrdU selanjutnya digunakan untuk mendeteksi BrdU yang menyatu tersebut, yang selanjutnya menunjukkan bahwa sel sedang aktif bereplikasi. Ikatan antibodi ini membutuhkan denaturasi DNA.¹⁴

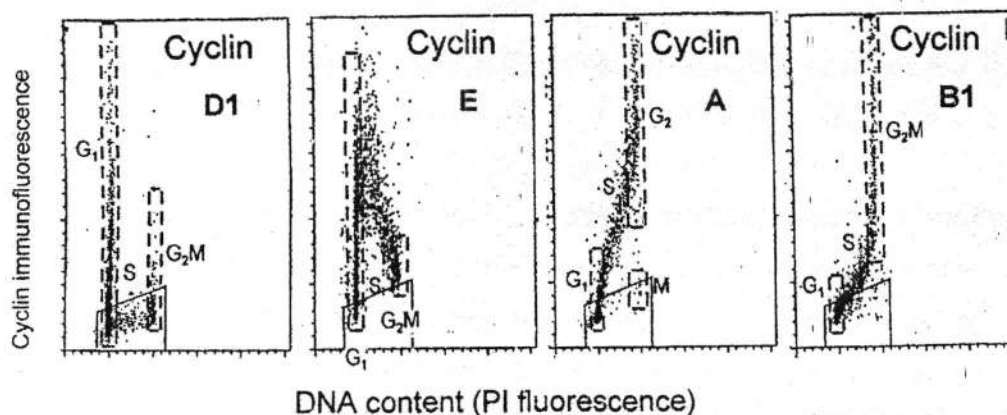
Metode ini merupakan metode klasik. Prosedur ini memerlukan DNA yang didenaturasi sebagian. Denaturasi ini diperlukan karena antibodi BrdU hanya akan mengikat BrdU yang menyatu pada DNA untai tunggal. DNA sisanya yang tidak terdenaturasi selanjutnya tercatat dengan *propidium iodide* (PI). Fluoresens hijau yang ditimbulkan dari antibodi berkonjugat fluoresens pada hakekatnya mengukur BrdU. Fluoresensi merah dari PI mengukur kandungan DNA. Denaturasi DNA dapat menggunakan panas ataupun HCl molaritas tinggi. Metode ini dapat digunakan baik untuk sel yang terfiksasi maupun tidak.¹

Oleh karena BrdU dapat menggantikan posisi timidin selama replikasi DNA, hal ini dapat menyebabkan mutasi, sehingga penggunaannya berpotensi membahayakan kesehatan, sekalipun demikian penelitian proliferasi sel kanker *in vivo* menggunakan bahan ini masih cukup banyak dipakai. ¹

5.2 Metode *cyclins/propidium iodide*

Cyclins merupakan komponen kunci penggerak laju siklus sel. Ekspresi terutama *cyclin* D, E, A dan B1 memberikan peran penting untuk memulainya siklus sel dan pembelahan sel. Pada prosedur ini ekspresi siklus sel dideteksi menggunakan antibodi monoklonal spesifik (mAbs) dan dianalisis kandungan DNA nya. Secara umum, puncak ekspresi *cyclin* D1 dapat dideteksi pada awal G1, puncak *cyclin* E khas pada transisi G1/S, puncak *cyclin* A dapat dideteksi selama fase G2/M dan *cyclin* B1 khas pada akhir G2/M. Metode ini dibandingkan metode yang lain dapat membedakan fase G0 dari G1 dan fase G2 dari M. Hal yang perlu diperhatikan adalah tidak semua tipe sel bersifat sama (sebagai contoh, *cyclin* D1 terdeteksi tidak hanya pada G0/G1 tetapi juga pada G2/M, sekalipun sangat jarang sel bertipe seperti ini).

Berdasarkan analisis bivariat antara ekspresi *cyclin* dan kandungan DNA membuatnya memungkinkan membedakan antara sel yang mempunyai kandungan DNA sama tetapi berada pada fase siklus yang berbeda, seperti antara sel pada G2 dan M berdasarkan perbedaan kandungan *cyclin* A, atau antara sel diploid G2 dan tetraploid G1 berdasarkan pada perbedaan ekspresi *cyclin* E dan atau B1. Pada sel G0 kurang mengekspresikan *cyclin* tipe D atau E, sedangkan sel pada fase G1 mempunyai ekspresi *cyclin* D dan atau E positif (gambar 1).



Gambar 1. Distribusi bivariat (*scatterplots*) menunjukkan pola karakteristik dari ekspresi *cyclin* D1, E, A dan B1 terhadap kandungan DNA pada sel normal, nontumor. *Cyclin* D1 diukur pada fibroblast yang sedang tumbuh dari manusia normal, sedangkan *cyclin* E, A dan B1 diukur pada limfosit manusia yang distimulasi mitogen. Batas populasi G1 dan G2/M ditandai dengan garis putus-putus. Jendela trapezoid menunjukkan tingkat latar belakang fluoresensi unspezifik, yang diukur terpisah, menggunakan antibodi isotipik tidak relevan. Pada gambar tampak bahwa *cyclin* D1 diekspresikan oleh fraksi sel G1; sel memasuki dan melanjutkan tahap S, dan sebagian besar sel pada G2/M memiliki *cyclin* D1 negatif. *Cyclin* E secara maksimal diekspresikan oleh sel yang memasuki S, dan kadarnya turun selama perjalanan melalui S. *Cyclin* A diekspresikan oleh sel pada fase S dan maksimal oleh sel G2; sel mitotik (setelah prometafase) memiliki *cyclin* A negatif. *Cyclin* B1 diekspresikan oleh sel dalam fase S lanjut, dan maksimal pada G2 dan M.¹³

5.3 Pengecatan dengan *propidium iodide* (PI)

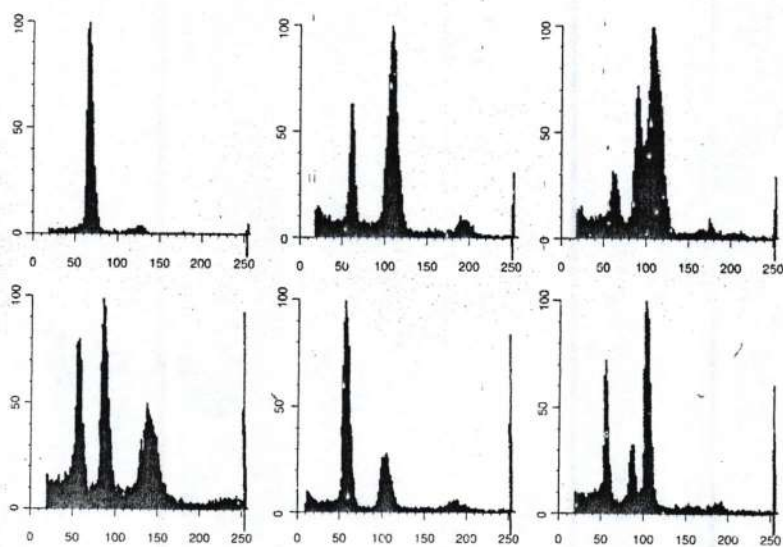
Prinsip pada pemeriksaan ini yaitu dengan membuat membran luar sel normal permeabel dengan memberi deterjen atau alkohol supaya *propidium iodide* dapat memasuki inti. Penambahan RNase dapat diberikan bila kita menginginkan RNA rantai ganda tidak turut memberikan kontribusi. Filter merah dan tabung fotomultiplier digunakan untuk mendeteksi fluoresensi merah. Hasil fluoresensi partikel inti dari sel normal, tidak sedang membelah akan tampak pada histogram sebagai puncak tunggal yang sempit, semua partikel memancarkan sejumlah fluoresensi merah yang hampir sama, hal ini mendukung pengetahuan yang ada bahwa pada inti semua organisme yang normal, tidak sedang membelah mengandung sejumlah DNA yang sama.¹

Pada histogram flowsitometri memberikan hasil yang berbeda sesuai keberadaan inti. Berdasarkan kandungan DNA sel dibagi menjadi: sedang dalam siklus (tidak istirahat), pada keadaan ini kita akan mendapati sejumlah nukleus dengan jumlah DNA 2N (sel pada fase G0 atau G1), sejumlah nukleus dengan jumlah DNA 4N (sel pada fase G2 atau M), dan sejumlah nukleus dengan jumlah DNA berbeda yang terbentang diantara populasi 2N dan 4N (gambar 5,6).¹

Histogram dibagi menjadi 4 marka, yaitu area sel dengan inti 2N, 4N dan diantaranya yang berarti dalam fase sintesis. Metode flow sitometri ini menghitung proporsi sel yang berada pada proses pembentukan DNA dan tidak terpengaruh dengan peningkatan jumlah

total sel. Flowsitometri dan pengecatan *propidium iodide* ini merupakan teknologi yang sesuai untuk menganalisis proliferasi sel. Gambar 6 merupakan contoh histogram siklus sel DNA normal.¹

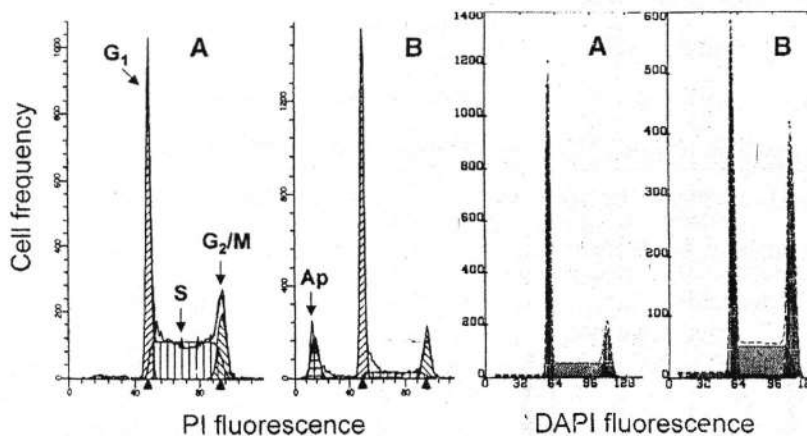
Gambaran histogram pada sampel jaringan ganas sering mengindikasikan adanya sel dengan jumlah DNA yang salah. Pada sel normal disebut euploidi atau diploid normal, sedangkan sel abnormal digunakan istilah aneuploidi atau DNA aneuploidi. Contoh histogram yang berasal dari beberapa jaringan ganas seperti tampak pada gambar 2. Puncak abnormal mungkin memiliki jumlah DNA lebih atau kurang dibandingkan sel normal (hiperdiploidi atau hipodiploidi). Jaringan apapun yang memberikan hasil histogram dengan puncak lebih dari satu dikategorikan sel abnormal.¹



Gambar 2. Histogram hasil fluoresensi *propidium iodide* dari inti sel yang diambil dari jaringan normal (kanan atas) dan tumor ganas payudara. Data courtesy of Colm Hennessy.¹

5.4 Pengecatan dengan 4', δ '-diamidino-2-phenylindole (DAPI)

Prinsip pengecatan DAPI ini sama dengan PI dan histogram yang terbentuk pun hampir sama (Gambar 3).



Gambar 3. Histogram frekuensi kandungan DNA yang ditunjukkan dari sel kultur yang tidak diberi perlakuan (A) dan dari kultur yang diberi perlakuan pemberian obat yang mempengaruhi distribusi siklus sel dan menginduksi apoptosis (B). Sel dicat dengan PI atau DAPI sesuai protokol, Fluoresens dari sel yang dicat PI diukur menggunakan FACScan (Becton Dickinson Immunocytometry Systems) dan software Modfit dekonvolusi. Fluoresens DAPI diukur menggunakan EPICS ELITE cytometer (Beckman/Coulter, Inc.) dan histogramnya diplot pada program MultiCycle (Phoenix Flow Systems). Kedua program software memberikan perkiraan persentase sel dengan kandungan pecahan DNA (sel apoptotik) dan sel pada fase G₁, S, G₂/M dari siklus sel.¹³

KESIMPULAN

Pemanfaatan flowsitometri untuk menentukan diagnosis tipe leukemia yaitu myeloid, limfoid B atau T. Selain itu juga untuk menentukan subtype dari leukemia. Pada myeloid dibedakan menjadi subtype AML M₀, myeloid, monositik, megakaryositik dan eritroid lineage. Pada ALL B dibedakan menjadi subtype pro, common, pre dan matur B, sedangkan pada ALL T meliputi pro, pre, cortical dan matur T.

Pada deteksi MRD biasanya digunakan untuk menentukan keberadaan dan jumlah klon abnormal yang tersisa yang mana hal ini tidak dapat terdeteksi dari pemeriksaan morfologi hapusan sumsum tulang. Klon abnormal ini biasanya ditandai dengan ekspresi menyimpang dari sel blast yang tidak dijumpai pada sel blast normal. Ekspresi menyimpang yang paling sering pada AML adalah CD56 dan CD65, pada ALL B yaitu CD13, CD33, CD65 dan CD21, sedangkan pada ALL T yaitu TdT.

Pemeriksaan Cd34+ stem cell dilakukan untuk penatalaksanaan pasien yang mendapatkan terapi transplantasi sumsum tulang, yang biasanya dimonitoring saat awal, setelah pemberian faktor pertumbuhan, setelah dilakukan pembiakan di luar, setelah afaresis dan ketika akan dimasukkan ke tubuh pasien.

Pemeriksaan lain yang masih dalam tahap riset yaitu apoptosis dan proliferasi sel serta DNA indeks untuk menentukan aneuploidi DNA. Pemeriksaan apoptosis yang dapat

dilakukan dengan metode annexin V, suatu protein yang mengikat fosfatidilserin yang seharusnya terletak pada membran bagian dalam tetapi terekspos keluar ketika proses apoptosis; pemeriksaan caspase-3 aktif, suatu enzim kunci pada proses apoptosis; pemeriksaan protein pro dan anti apoptosis seperti protein bcl-2, dan pemeriksaan produk enzim yang terdegradasi selama proses apoptosis seperti PARP fragmen 89 kDa.

Pemeriksaan proliferasi sel dapat digunakan dengan pengecatan BrdU, PI dan DAPI, sehingga dapat diketahui siklus pembelahan sel mulai G0/G1, sintesis hingga G2/M (mitosis). Pada teknik ini dapat diketahui pula aneuploidi dari DNA. Selain itu proliferasi sel dapat diperiksa juga menggunakan antibodi tertentu pada protein yang terlibat dalam siklus pembelahan sel seperti antibodi terhadap *cyclin* dan *cyclin dependent kinase* (CDK).

DAFTAR PUSTAKA

1. Givan AL (2001). Flow Cytometry First Principles. 2nd ed. Wiley-Liss Inc. New York, p 123-57.
2. Orfao A, Lopez A, Flores J, Vidriales B, Perez J, Kneba M, et al. Diagnosis of Haematological Malignancies : New Application for Flow Cytometry. Hematology-The European Hematology association Program 2006;2(1).
3. Behm FG. Classification of Acute Leukemias. In: Pui CH (ed.). Treatment of Acute Leukemias New Directions for Clinical Research. Humana Press, XVI, 2003: pp 43-58.
4. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Thiele J, Borowitz MJ, Le Beau MM, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. Blood. 2016;127(20):2391-405.
5. Nguyen MD, Diamond LW, Braylan RC (2003). Flow Cytometry in Hematopathology. Humana Press Inc. New Jersey. p 4-15.
6. Al-Mawali, Gillis D, Lewis I. The Role of Multiparameter Flow Cytometry for Detection of Minimal Residual Disease in Acute Myeloid Leukemia. American Journal Clinical Pathology 2009;131: pp 16-26.
7. Campana D, Pui CH. Detection of Minimal Residual Disease in Acute Leukemia: Methodologic Advances and Clinical Significance. Blood 1995; 85(6): p. 1416-34
8. Grimwade D, Freeman SD. Defining minimal residual disease in acute myeloid leukemia: which platforms are ready for "prime time"? Blood. 2014;124(23):3345-55
9. Tanavde V. Application of Flow Cytometry in Stem Cell Analysis. Hematopoietic Stem Cell Laboratory. Reliance Life Science. International Society for Advancement of Cytometry (ISAC) Jakarta, 2015
10. Hingorani R, Deng J, Elia J, McIntyre C, Mitta D (2011). Detection of Apoptosis Using the BD Annexin V FITC Assay on the BD FACSVerser™ System. BD Biosciences. Accessed 04.11.13 from: http://www.bdbiosciences.com/documents/BD_FACSVerser_Apoptosis_Detection_AppNote.pdf.
11. Dash P (2014). Apoptosis-or programmed cell death- is essential for removing cells that have become damaged, infected or unwanted. Accessed 26.06.14 from: <http://www.reading.ac.uk/nitricoxide/intro/apoptosis/>
12. Chaitanya GV, Steven AJ, Babu PP (2010). PARP-1 Cleavage Fragments: Signature of Cell-death proteases in neurodegeneration. Cell Communication and Signaling 8:31 hFavaloro B, Allocati N, Graziano V, Di Ilio C, De Laurenzi V (2012). Role of Apoptosis in disease. AGING 4(5), pp 330-49.
13. Pozarowski P, Darzynkiewicz Z. Analysis of Cell Cycle by Flow Cytometry (2013). In: Schönthal AH. Methods in Molecular Biology, vol 281: Checkpoint Controls and Cancer, vol 2: Activation and Regulation Protocols. Humana Press Inc., Totowa, NJ. Accessed: 04.11.13 from: <http://www.Springer.com>.
14. BrdU Flow Kits Instruction Manual. Available at: <http://www.Bdj.co.jp>. Accessed 05.04.14.