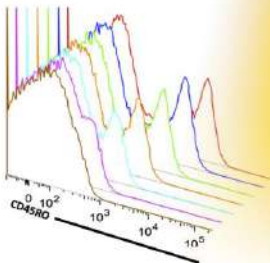
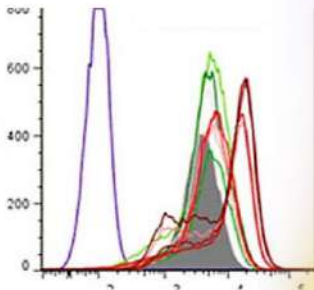
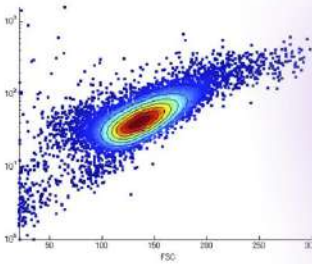




# PEDOMAN NASIONAL PENGUNAAN FLOWSITOMETRI PADA DIAGNOSIS LEUKEMIA AKUT



PENGURUS PUSAT PERHIMPUNAN DOKTER SPESIALIS PATOLOGI  
KLINIK DAN KEDOKTERAN LABORATORIUM INDONESIA  
(PDS PATKLIN)

**PEDOMAN NASIONAL  
PENGUNAAN FLOWSITOMETRI PADA  
DIAGNOSIS LEUKEMIA AKUT**



**PENERBIT**

**Perhimpunan Dokter Spesialis Patologi Klinik dan  
Kedokteran Laboratorium Indonesia**

Jl Lontar No 5, Menteng Atas, Sahardjo

Jakarta Selatan 12960

Indonesia

2022

# **PEDOMAN NASIONAL PENGUNAAN FLOWSITOMETRI PADA DIAGNOSIS LEUKEMIA AKUT**

## **Redaksi**

Kelompok Kerja Hematologi PDS PatKLIh  
Jl Lontar No 5, Menteng Atas, Sahardjo, Jakarta Selatan 12960  
Indonesia

## **Penerbit**

Perhimpunan Dokter Spesialis Patologi Klinik dan Kedokteran Laboratorium Indonesia  
Jl Lontar No 5, Menteng Atas, Sahardjo, Jakarta Selatan 12960  
Indonesia

## **Desain Sampul dan Tata Letak**

dr. Hubertus H Hayuanta, SpPK  
dr. Tri Kusuma W, SpPK

## **Cetakan pertama, Januari 2023**

Hak cipta dilindungi undang-undang  
Dilarang memperbanyak sebagian atau seluruh isi buku ini dalam bentuk dan  
dengan cara apapun tanpa ijin tertulis dari penerbit

# PEDOMAN NASIONAL PENGGUNAAN FLOWSITOMETRI UNTUK DIAGNOSIS LEUKEMIA AKUT

## KONTRIBUTOR

PROF. DR. DR. ARYATI, MS, SP.PK(K) | KETUA UMUM

DR. DR. TEGUH TRIYONO, M.KES, SP.PK(K) | KETUA I

DR. DR. SRI HARTINI, SP.PK(K), MARS | KETUA II

DR. MARINA MARIA LUDONG, SP.PK | SEKRETARIS JENDRAL

DR. BETTY AGUSTINA TAMBUNAN, SP.PK(K) | BENDAHARA

DR. DR. AGUS SUSANTO KOSASIH, SPPK(K) | KETUA POKJA HEMATOLOGI

PP FDS PatKlin

PROF. DR. DR. MANSYUR ARIEF, SPPK(K)

RSUP dr. Wahidin Sudirohusodo

DR. DR. DELITA PRIHATNI, SPPK(K), MKES

RSUP Hasan Sadikin

DR. DR. DEWI WULANDARI, SPPK(K), MSC

DR. REIVA WISDHARILLA, SPPK

RSUPN dr. Cipto Mangunkusuma

DR. DR. LYANA SETIAWAN, SPPK(K)

DR. CHRISTINE SUGIARTO, SPPK(K)

DR. TRI KUSUMA W, SPPK

RS Kanker Dharmas-Pusat Kanker Nasional

DR. LIDYA UTAMI, SP.PK(K)

RSUP Fatmawati

DR. DR. NYOMAN SUCI WIDYASTUTI, M.KES, SPPK(K)

RSUP dr. Kariadi

DR. DR. USI SUKORINI, SPPK(K)

DR. DR. UMI INTANSARI, SPPK(K)

RSUP dr. Sardjito

DR. B. RINA A. SIDHARTA, SPPK(K)

DR. M. I. DIAH PRAMUDIANTI, MSC, SP.PK(K)

RSUP dr. Moewardi

DR. YETTY HERNANINGSIH, SPPK(K)

DR. PAULUS BUDIONO, SPPK(K)

RSUP dr. Soetomo

DR. FRIDAYENTI, SPPK

RSUD Arifin Ahmad

DR. PHEY LIANA, SPPK

RSUD dr. Mohammad Hoesin

DR. MALAYANA R, NST, MKED (CLINPATH) SPPK

RSUP Adam Malik

DR. FX HENDRIYONO, SPPK

RSUD Ulin Banjarmasin

DR. DR. SIANNY HERAWATI, SPPK(K)

RSUP Sanglah

DR. IDA AYU W. MAHAYANI, SPPK

RSUD Badung

DR. DR. EFRIDA M.KES, SPPK(K)

RSUD M Djamil

DR. HESSYANI P. T. RARANTA, SPPK

RSUP Prof. dr. R.D. Kandou

# **SAMBUTAN**

## **KETUA UMUM PENGURUS PUSAT PERHIMPUNAN DOKTER SPESIALIS PATOLOGI KLINIK DAN KEDOKTERAN LABORATORIUM INDONESIA**

Salam PDS PatKLIn,

Puji syukur kepada Tuhan Yang Maha Kuasa dan terima kasih kepada Pokja Hematologi PP PDS PatKLIn serta para kontributor atas upayanya sehingga buku Pedoman Nasional Penggunaan Flowsitometri Pada Diagnosis Leukemia Akut edisi pertama ini dapat terbit di tahun 2022.

Flowsitometri memegang peranan penting dalam penegakkan diagnosis dan klasifikasi leukemia akut. Awalnya imunofenotiping di Indonesia terbatas hanya di beberapa fasilitas kesehatan atau di beberapa pusat pendidikan saja. Kementerian Kesehatan Republik Indonesia mendorong pemerataan pelayanan kanker di Indonesia dengan mengadakan fasilitas flowsitometri di beberapa rumah sakit di Indonesia. Oleh karena itu, PDS PatKLIn mendukung program kementerian dengan membuat suatu pedoman penggunaan flowsitometri yang bertujuan menyamakan langkah penggunaan, pengerjaan dan interpretasi flowsitometri untuk membantu penegakkan diagnosis leukemia akut.

Semoga buku ini dapat dimanfaatkan dengan sebaik-baiknya.

Ketua Umum Pengurus Pusat PDS PatKLIn

Prof. Dr. dr. Aryati, MS, Sp,PK(K)

# **SAMBUTAN**

## **KETUA KELOMPOK KERJA HEMATOLOGI PERHIMPUNAN DOKTER SPESIALIS PATOLOGI KLINIK DAN KEDOKTERAN LABORATORIUM INDONESIA**

Salam PDS PatKLin,

Puji syukur kami panjatkan kepada Tuhan Yang Maha Esa atas rampungnya Pedoman Nasional Penggunaan Flowsitometri Pada Diagnosis Leukemia Akut. Terima kasih saya ucapkan kepada ketua umum PP PDS PatKLin yang telah mendukung kelompok kerja hematologi menyelesaikan buku ini. Tidak lupa saya ucapkan terima kasih kepada Kelompok Kerja Hematologi PDS PatKLin dan para kontributor yang telah berupaya mewujudkan buku ini.

Buku pedoman ini dibutuhkan oleh dokter spesialis patologi klinik dan dokter di bidang lain terkait keganasan darah untuk penegakan diagnosis leukemia akut menggunakan modalitas flowsitometri. Buku Pedoman Nasional Penggunaan Flowsitometri Pada Diagnosis Leukemia Akut mengulas kesiapan Indonesia dalam penanganan leukemia akut serta pengalaman penggunaan flowsitometri, dan memaparkan standar pengerjaan flowsitometri yang baik untuk diagnosis, stratifikasi, dan evaluasi leukemia akut, serta rekomendasi panel pemeriksaan flowsitometri. Tujuan buku pedoman ini diterbitkan adalah memudahkan pemahaman dan implementasi flowsitometri dalam manajemen leukemia akut.

Diharapkan dengan terbitnya buku ini dapat meningkatkan mutu pelayanan flowsitometri di laboratorium dan membuat interpretasi terstandar untuk diagnosis dan evaluasi leukemia akut

yang pada akhirnya akan membantu klinisi dalam pengelolaan pasien.

Semoga buku ini membawa manfaat bagi rekan-rekan sejawat patologi klinik, dan sejawat dokter dalam manajemen pasien leukemia akut.

Ketua Kelompok Kerja Hematologi PDS PatKLIIn

Dr. dr. Agus Susanto Kosasih, SpPK(K), MARS

# DAFTAR ISI

<b>SAMBUTAN KETUA UMUM PDS PatKLI</b>	i
<b>SAMBUTAN KETUA KELOMPOK KERJA HEMATOLOGI</b>	ii
<b>BAB I PENDAHULUAN</b>	1
1.1. Epidemiologi leukemia akut	1
1.2. Masalah dan kondisi di Indonesia	2
<b>BAB II DIAGNOSIS LEUKEMIA AKUT</b>	12
2.1. Diagnosis dan klasifikasi leukemia akut berdasarkan WHO	12
2.1.1. <i>Acute myeloid leukemia</i> (AML) dengan kelainan genetik berulang	15
2.1.2. <i>Acute myeloid leukemia</i> dengan perubahan terkait mielodisplasia	16
2.1.3. Neoplasma mieloid terkait terapi	18
2.1.4. <i>Acute myeloid leukemia, not otherwise specified</i> .....	19
2.1.5. Sarkoma mieloid	22
2.1.6. Proliferasi mieloid pada sindrom Down	22



2.1.7. Leukemia akut galur ambigu .....	22
2.1.8. Leukemia/limfoma limfoblastik sel B (B-ALL) .....	23
2.1.9. B-ALL dengan amplifikasi intrakromosomal kromosom 21.....	24
2.1.10. B-ALL dengan translokasi yang melibatkan tirosin kinase atau reseptor sitokin (“ <i>BCR-ABL1-like</i> <i>ALL</i> ”) .....	24
2.1.11. Leukemia/limfoma limfoblastik sel-T (T-ALL) .....	25
2.2. Beberapa rekomendasi untuk leukemia akut .....	26
2.2.1. <i>Acute myeloid leukemia in adult patients: ESMO clinical practice guidelines for diagnosis, treatment, and follow-up</i> .....	26
2.2.2. <i>Acute myeloid leukemia, version 3.2019, NCCN Clinical Practice Guidelines In Oncology</i> .....	28
2.2.3. <i>Initial diagnostic workup of acute leukemia, guidelines by College of American Pathologists and American Society of Hematology</i> .....	33
2.3. Modalitas pemeriksaan pada leukemia akut.....	36
2.3.1. <i>Hematology analyzer</i> .....	36

2.3.1.1. Histogram leukosit.....	37
2.3.1.2. Scattergram hitung jenis leukosit .....	38
2.3.2. Morfologi sel.....	41
2.3.2.1. Biopsi dan apusan aspirasi sumsum tulang .....	42
2.3.2.2. Sitokimia .....	44
2.3.2.3. Imunohistokimia.....	44
2.3.3. Flowsitometri.....	45
2.3.4. Pemeriksaan sitogenetik.....	46
2.3.5. Pemeriksaan molekuler .....	46
2.4. Algoritme penggunaan flowsitometri pada leukemia akut di Indonesia .....	47
2.4.1. Pendahuluan .....	47
2.4.2. Peranan sitomorfologi pada leukemia .....	48
2.4.2.1 Klasifikasi berdasarkan FAB.....	48
2.4.2.2 Klasifikasi berdasarkan WHO .....	49
2.4.3. Diagnosis leukemia.....	50
2.4.4. Peran flowsitometri pada dugaan leukemia .....	52
2.4.5. Algoritme diagnosis leukemia .....	53

<b>BAB III DASAR-DASAR FLOWSITOMETRI .....</b>	<b>58</b>
3.1. Pendahuluan .....	58
3.2. Prinsip flowsitometri .....	60
3.2.1. Sistem alir.....	60
3.2.2. Sistem optik.....	62
3.2.2.1. Pendaran cahaya (light scatter).....	63
3.2.2.2. Fluoresensi.....	65
3.2.3. Sistem elektronik .....	68
3.3. Analisis data .....	70
3.3.1. <i>Forward scatter</i> dan <i>side scatter</i> .....	72
3.3.2. Satu parameter menggunakan histogram .....	72
3.3.3. Dua parameter menggunakan <i>density plot/dot plot</i> .....	73
3.3.4. <i>Back gating</i> untuk konfirmasi populasi .....	73
3.4. Pemantapan mutu.....	74
<b>BAB IV LEUKEMIA PHENOTYPING .....</b>	<b>79</b>
4.1. Panduan rujukan leukemia akut .....	77
4.2. Panel dasar imunofenotiping leukemia akut .....	81
4.3. Panel penyaring dan panel konfirmasi.....	81

4.4. <i>Extended panel leukemia phenotyping</i> .....	85
4.5. Panel kapasitas ekstensif .....	87
<b>BAB V PENERAPAN IMUNOFENOTIPING LEUKEMIA DI INDONESIA</b> .....	95
5.1. Sejarah .....	95
5.2. Panel diagnosis leukemia akut .....	99
5.3. Aplikasi flowsitometri dalam penatalaksanaan leukemia akut .....	102
<b>BAB VI PRA-ANALITIK, ANALITIK, DAN PITFALLS PADA PEMERIKSAAN IMUNOFENOTIPING LEUKEMIA</b> .....	107
6.1. Pra analitik .....	108
6.1.1. Formulir permintaan .....	108
6.1.2. Pengambilan dan penampungan sampel .....	108
6.1.3. Transpor sampel .....	111
6.1.4. Preparasi sampel .....	112
6.2. Analitik .....	113
6.3. <i>Pitfalls</i> flowsitometri dalam diagnosis kelainan hematologi .....	116

6.3.1. Masalah pra analitik .....	116
6.3.2. Masalah analitik.....	120
6.3.3. Masalah interpretasi data.....	123
<b>BAB VII PENUTUP .....</b>	<b>128</b>
<b>Lampiran 1. Standar prosedur persiapan sampel dan pewarnaan menurut EuroFlow .....</b>	<b>130</b>
<b>Lampiran 2. Strategi gating dan interpretasi panel 8-color 3 tube .....</b>	<b>133</b>
<b>Lampiran 3. Formulir permintaan pemeriksaan fenotiping leukemia .....</b>	<b>139</b>
<b>Lampiran 4. Ilustrasi kasus .....</b>	<b>140</b>

# BAB I

## PENDAHULUAN

### 1.1. Epidemiologi leukemia akut

Kanker merupakan sekelompok besar penyakit yang disebabkan pertumbuhan sel yang abnormal dan dapat terjadi di semua organ atau jaringan di tubuh. Berdasarkan laporan *International Agency for Research on Cancer* dari *World Health Organization* (WHO) pada tahun 2020, estimasi insiden kanker pada semua usia baik pria dan wanita per 100.000 penduduk di Indonesia adalah 141,1 dengan 10 kasus tertinggi yaitu kanker payudara, paru-paru, kolorektal, abdomen, prostat, serviks, uterus, hati, esofagus, ovarium dan tiroid (WHO, 2020).



**Gambar 1.1.** Sepuluh besar kasus kanker tertinggi di Indonesia (INFODATIN, 2019)

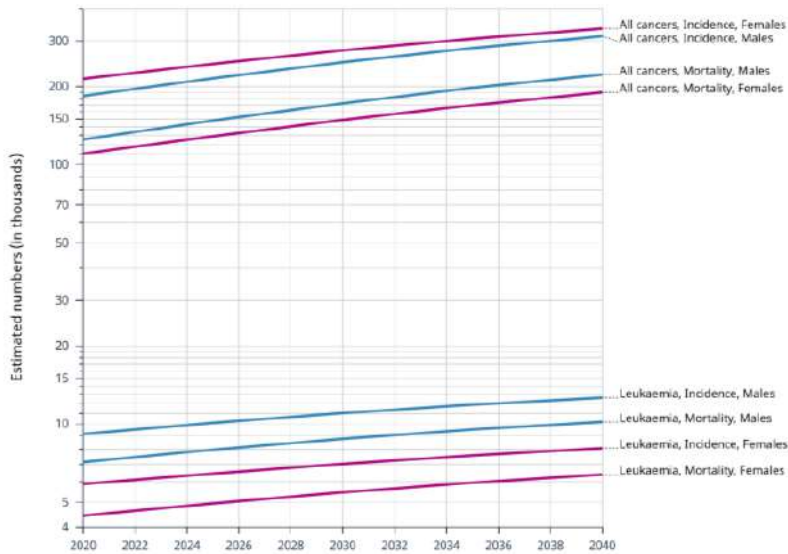
Data di Indonesia menunjukkan proporsi kasus kanker tertinggi pada semua penduduk, baik lelaki dan perempuan, yaitu kanker payudara sebesar 19,18%, diikuti serviks (10,69%), paru-paru (9,89%), kolorektal (9,88%), hati (6,08%), nasofaring (5,92%), limfoma Non-Hodgkin (4,66%), leukemia (4,44%), ovarium (4,38%), dan tiroid (3,78%). Kasus tertinggi pada lelaki adalah kanker paru (16,77%), sedangkan pada perempuan adalah kanker payudara (34,30%) (Gambar 1.1) (INFO-DATIN, 2019).

Leukemia merupakan suatu kanker sel pembentuk darah, tersering adalah dari seri leukosit. Leukemia dapat dikelompokkan menjadi leukemia akut dan leukemia kronik (*American Cancer Society*, 2021). Berdasarkan estimasi jumlah kasus baru leukemia di seluruh dunia, Indonesia menempati ranking ke 73, dan dari seluruh benua Asia, Indonesia menempati ranking ke-7 estimasi jumlah kematian pada tahun 2020. Estimasi insiden leukemia di Indonesia per 100.000 penduduk pada seluruh usia, baik itu lelaki dan perempuan, sebesar 5,6. Prediksi estimasi kasus leukemia dari tahun 2020 sampai dengan 2040 dapat dilihat pada Gambar 1.2 di bawah ini (WHO, 2020).

## **1.2. Masalah dan kondisi di Indonesia**

Kelompok kerja (Pokja) Hematologi Pengurus Pusat (PP) Perhimpunan dokter spesialis patologi klinik dan Kedokteran Laboratorium Indonesia (PDS PatKLI) tahun 2021 melakukan pemetaan melalui *google form* untuk melihat *Indonesian Evidence Based Diagnostics of Acute Leukemia*. Pemetaan ini dilakukan pada 15 kontributor rumah sakit (RS) se-Indonesia meliputi RS Kanker Dharmais, RSUP Cipto Mangunkusumo, RSUP dr. Kariadi Semarang, RSUP Sanglah Denpasar, RSUP dr. Sardjito Yogyakarta, RSUP dr. Wahidin Sudirohusodo Makassar, RSUP Fatmawati Jakarta, RS dr. Hasan Sadikin Bandung, RSUD dr.

Moewardi Surakarta, RSUD Arifin Achmad Pekanbaru, RSUD dr. Soetomo Surabaya, RSUD Ulin Banjarmasin, RS dr. Mohammad Hoesin Palembang, RS Daerah Mangusada dan RSUP H. Adam Malik Medan.



**Gambar 1.2.** Prediksi estimasi kasus leukemia dari tahun 2020-2040 (WHO, 2020)

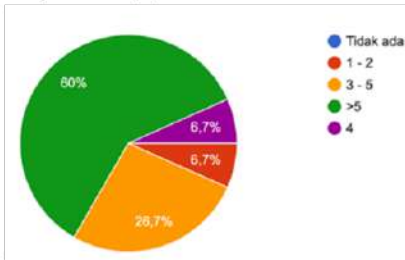
Sebagian besar memiliki jumlah total dokter spesialis patologi klinik (SpPK) lebih besar dari 5 orang (60%) dan paling sedikit 1-2 orang (6,7%). Hampir seluruh kontributor memiliki jumlah dokter spesialis penyakit dalam (SpPD) lebih dari 5 orang (93,3%) dan sisanya antara 3-5 orang (6,7%). Jumlah dokter spesialis penyakit dalam konsultan hematologi dan onkologi medik (KHOM) lebih dari 5 orang, antara 3-5 orang, dan 1-2 orang sebanyak 40%, 26,7% dan 33,3% (berturut-turut). Sebagian besar jumlah dokter spesialis anak (SpA) juga lebih dari 5 orang (80%) dengan jumlah konsultan hematologi lebih dari 5 orang, antara 3-



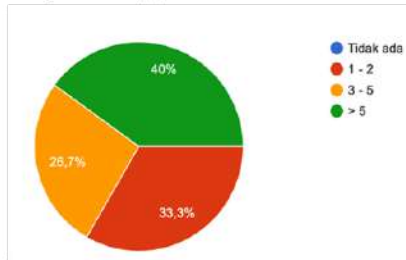
5 orang, dan 1-2 orang yaitu 13,3%, 46,6% dan 26,7% (berturut-turut), seperti pada Gambar 1.3 berikut ini.

Jumlah kasus baru leukemia akut pada pasien dewasa per bulan dalam 2 tahun terakhir yaitu antara 1-10, 11-20, 21-50, lebih dari 50 pasien, dan tidak mengetahui pasti didapatkan 33,3%, 20%, 6,7%, 26,7%, dan 13,3%, sedangkan pada pasien anak yaitu 26,7%, 13,3%, 13,3%, 26,7%, dan 20%, seperti pada Gambar 1.4 berikut ini.

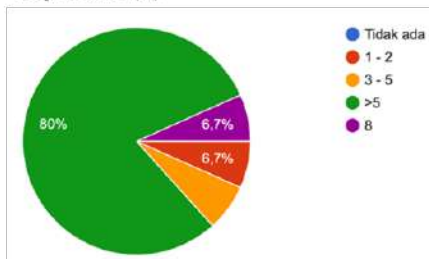
Jumlah dokter spesialis patologi klinik  
15 jawaban (A)



Jumlah dokter spesialis penyakit dalam  
15 jawaban (B)

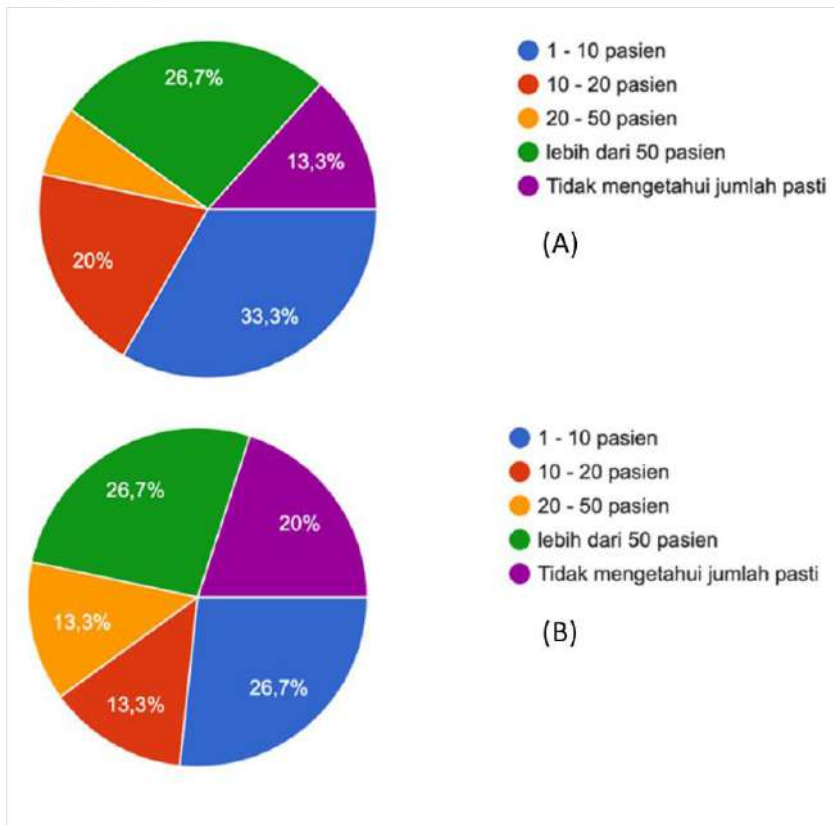


Jumlah dokter spesialis anak  
15 jawaban (C)



**Gambar 1.3.** Sebaran jumlah dokter di 15 kontributor RS  
(A) SpPK, (B) SpPD, dan (C) SpA

Jumlah kasus baru leukemia akut pada pasien dewasa per bulan dalam dua tahun terakhir  
15 jawaban

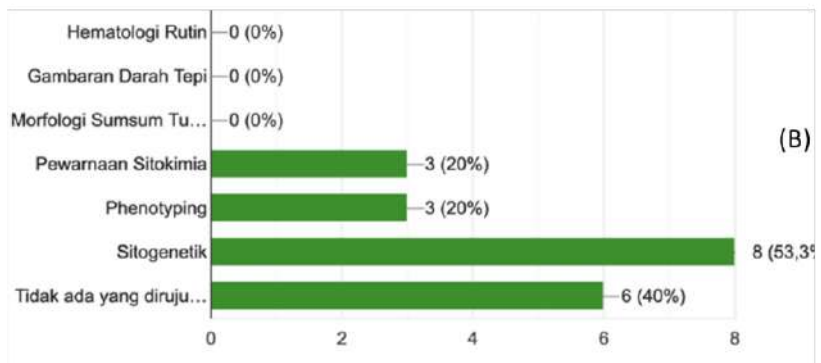
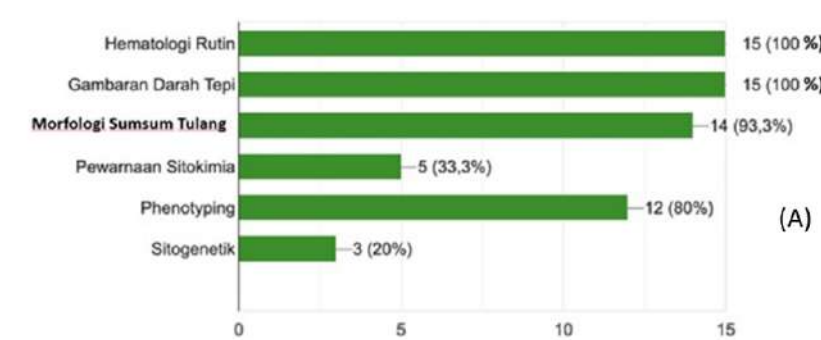


**Gambar 1.4.** Jumlah kasus baru leukemia akut per bulan dalam 2 tahun terakhir: (A) Dewasa, (B) Anak

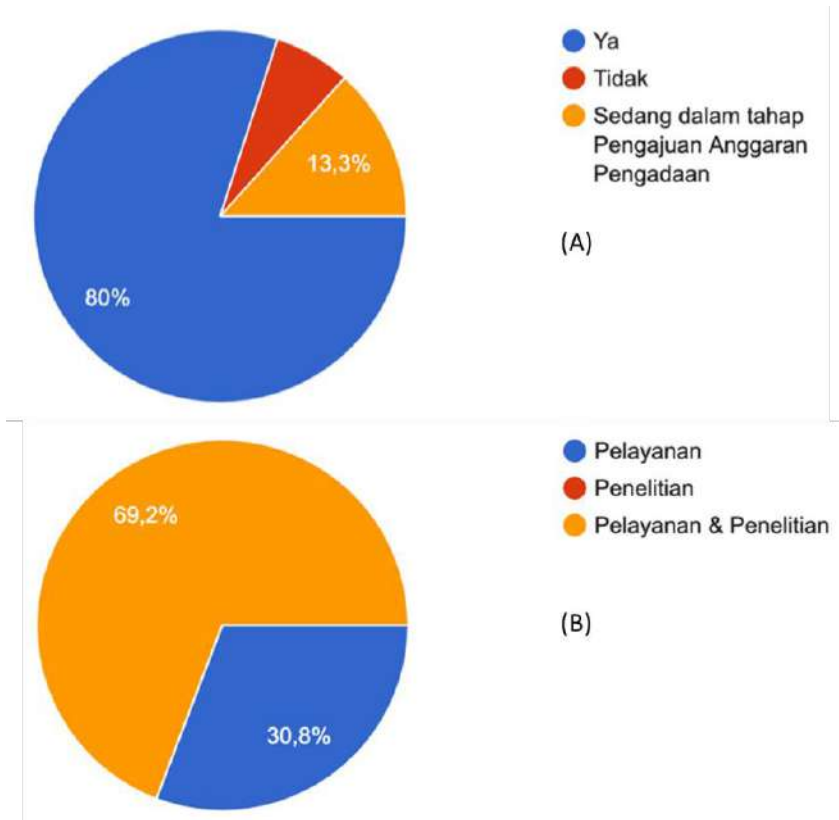
Tindakan diagnostik yang dilakukan di laboratorium dari masing-masing RS meliputi hematologi rutin (15 RS, 100%), gambaran darah tepi (15 RS, 100%), morfologi sumsum tulang (14 RS, 93,3%), pewarnaan sitokimia (5 RS, 33,3%), imunofenotiping (12 RS, 80%), dan sitogenetik (3 RS, 20%). Tindakan yang dirujuk ke RS atau laboratorium rujukan meliputi pewarnaan sitokimia (3 RS, 20%), imunofenotiping (3 RS, 20%),

sitogenetik (8 RS, 53,3%), serta tidak ada yang dirujuk (6 RS, 40%). Gambaran tindakan diagnostik yang dilakukan di laboratorium dapat dilihat pada Gambar 1.5 berikut ini.

Rumah sakit yang memiliki fasilitas alat flowsitometri sebanyak 80%, sedangkan RS yang tidak memiliki alat flowsitometri sebanyak 6,7%, dan RS yang sedang dalam tahap pengajuan anggaran pengadaan sebanyak 13,3% (Gambar 1.6A). Rumah sakit yang sudah memiliki alat flowsitometri menggunakan alat tersebut untuk pelayanan dan penelitian sebanyak 69,2%, sedangkan untuk pelayanan saja sebanyak 30,8% (Gambar 1.6B).



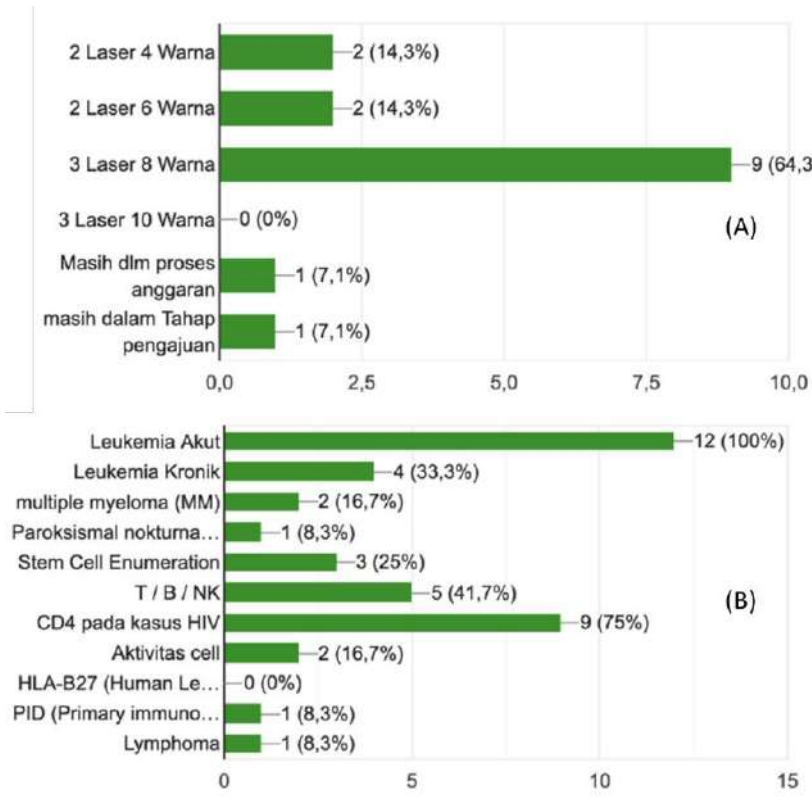
**Gambar 1.5.** Tindakan diagnostik: (A) Dilakukan di laboratorium, (B) Dirujuk



**Gambar 1.6.** Fasilitas alat flowsitometri: (A) Ketersediaan, (B) Penggunaan

Jumlah laser dan warna dari instrumen flowsitometri mulai dari yang terbanyak sampai dengan yang paling sedikit dimiliki yaitu 3 laser 8 warna (9 RS, 64,3%), 2 laser 4 warna (2 RS, 14,3%), 2 laser 6 warna (2 RS, 14,3%), masih dalam proses anggaran (1 RS, 7,1%), dan masih dalam tahap pengajuan (1 RS, 7,1%) (Gambar 1.7A). Pemeriksaan yang dapat dilakukan menggunakan alat flowsitometri yaitu leukemia akut (12 RS, 100%), CD4 pada kasus HIV (9 RS, 75%), T/B/NK (5 RS, 41,7%), leukemia kronik (4 RS, 33,3%), enumerasi sel punca (3 RS, 25%), mieloma multipel (MM) (2 RS, 16,7%), aktivitas sel (2 RS, 16,7%), *paroximal nocturnal*

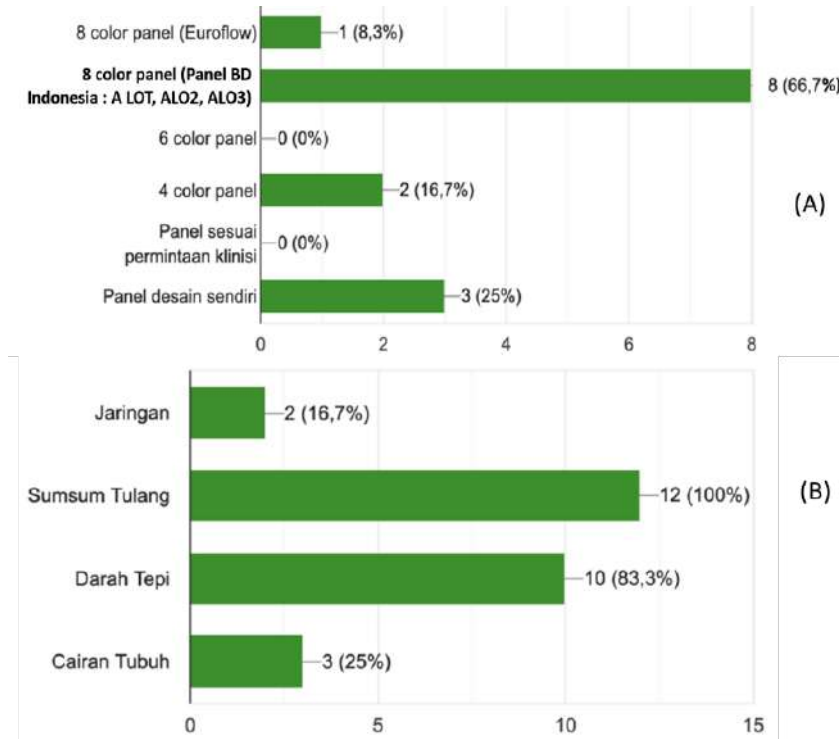
*hemoglobinuria* (PNH) (1 RS, 8,3%), *primary immunodeficiency disorders* (PID) (1 RS, 8,3%), dan limfoma (1 RS, 8,3%) (Gambar 1.7B).



**Gambar 1.7.** (A) Jumlah laser dan warna (B) pemeriksaan yang dilakukan pada alat flowsitometri

Panel reagen yang digunakan untuk pemeriksaan leukemia akut mulai dari yang terbanyak yaitu 8 *color panel* (Panel BD Indonesia: ALOT, ALO2, ALO3) sejumlah 8 RS (66,7%), panel desain sendiri 3 RS (25%), 4 *color panel* 2 RS (16,7%), dan 8 *color panel* (EuroFlow) 1 RS (8,3%) (Gambar 1.8A). Sampel yang sering digunakan untuk analisis flowsitometri pada kasus leukemia meliputi sumsum tulang, darah tepi, cairan tubuh, dan jaringan

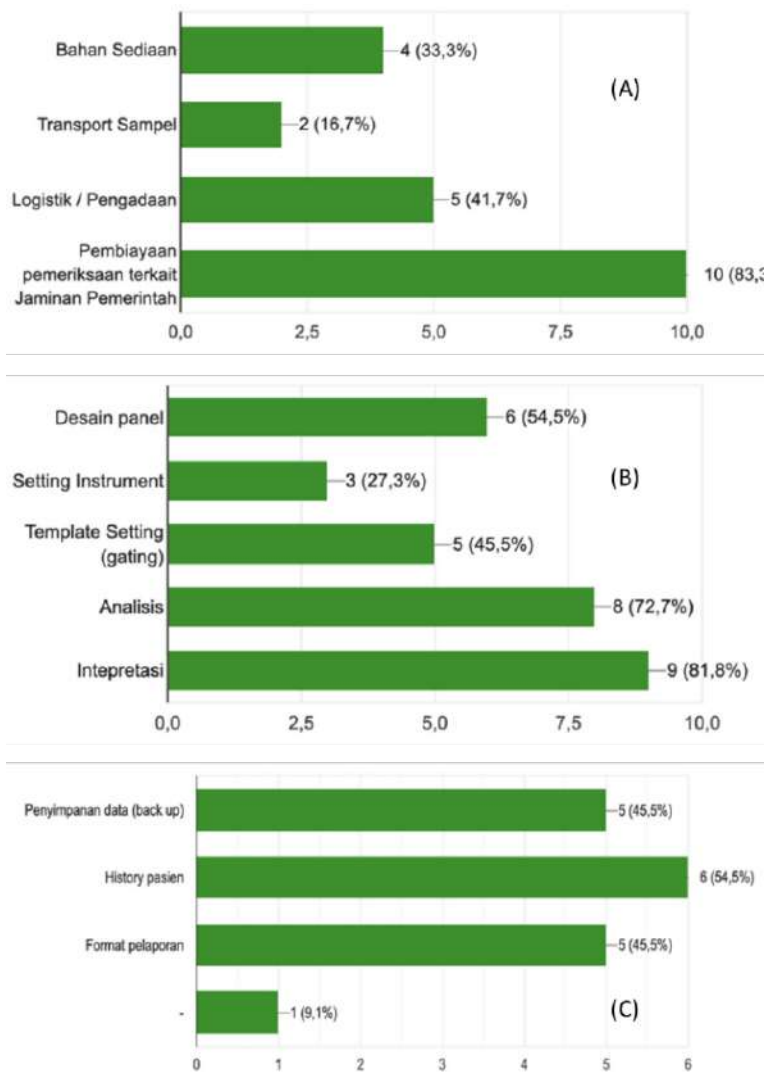
[12 RS (100%), 10 RS (83,3%), 3 RS (25%), dan 2 RS (16,7%)] (Gambar 1.8B).



**Gambar 1.8.** Panel reagen (A) dan sampel (B) untuk pemeriksaan leukemia akut.

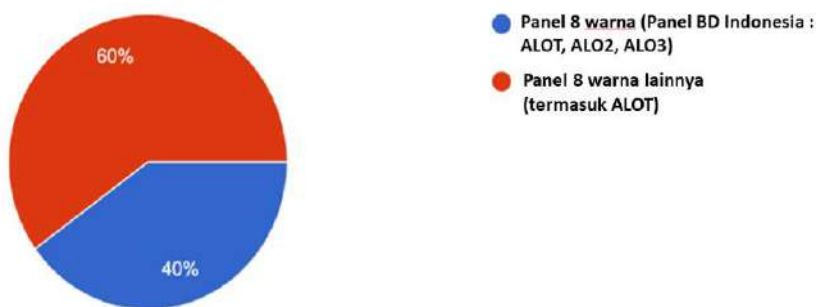
Kendala pra analitik, analitik, dan pasca analitik yang sering menjadi akar penyebab pada pemeriksaan flowsitometri (Gambar 1.9) meliputi pembiayaan pemeriksaan terkait jaminan pemerintah (10 RS, 83,3%), logistik/pengadaan (5 RS, 41,7%), bahan sediaan (4 RS; 33,3%), dan transportasi sampel (2 RS, 16,7,3%). Kendala analitik meliputi interpretasi (9 RS, 81,8,3%), analisis (8 RS, 72,7%), desain panel (6 RS, 54,5%), *template setting/gatting* (5 RS, 45,5%), dan *instrument setting* (3 RS, 27,3%). Kendala pasca analitik

meliputi riwayat pasien (6 RS, 54,5%), penyimpanan data (5 RS, 45,5%), format pelaporan (5 RS, 45,5%), dan lain-lain (1 RS, 9,1%).



**Gambar 1.9.** Kendala laboratorium (A) pra analitik, (B) analitik dan (C) pasca analitik

Panel yang digunakan adalah panel 8 warna BD Indonesia (ALOT, ALO2, ALO3) sejumlah 60% dan panel 8 warna lainnya (termasuk ALOT) sejumlah 40% (Gambar 1.10). Penanda antibodi yang digunakan untuk diagnosis *acute lymphoblastic leukemia* (ALL) dan *acute myeloblastic leukemia* (AML) dapat dilihat pada Gambar 11 berikut ini.



**Gambar 1.10.** Panel EuroFlow (lengkap atau parsial)

**Tabel 1.1.** Marker yang digunakan di Indonesia

Mieloid	Limfoid
CD34, HLA-DR, CD13, CD33, MPO	CD3, CD5, CD7, CD20, CD19, CD10, CD34, CD79a, HLA-DR
CD34, CD45, CD13, CD33, CD14, MPO	CD34, CD45, CD10, CD20, CD79a, CD19, CD3, CD2, CD7, HLA-DR
anti-MPO	CD79a, CD3, cyCD3, CD7, CD19
CD34, CD36, CD33, HLA-DR, CD13, CD14	CD34, HLA-DR, CD19, CD10, CD20
cyMPO, CD33, CD13, CD117, CD34, CD36, CD14, HLA-DR, GlyA/CD71, CD41a/CD61	cyCD3, sCD3, CD5, CD7, cyCD79a, CD19, CD20, CD10, HLA-DR, CD34, CD45
CD34, cyMPO	CD34, CD19, CD79a, CD3, cyCD3, CD7



# BAB II

## DIAGNOSIS LEUKEMIA AKUT

Prosedur diagnostik pada keganasan hematologi semakin berkembang dan membutuhkan keahlian hematologi lebih dalam untuk mendapatkan diagnosis yang akurat, hasil terapi sesuai target, serta prognosis yang relevan. Hal ini mendorong pengembangan standar internasional yang diperlukan untuk mencapai komparabilitas hasil analisis hematologi dalam rangka menegakkan diagnosis pada kasus keganasan hematologi. Pada Bab II ini akan dibahas berbagai klasifikasi diagnosis leukemia akut yang dipakai pada saat ini, berbagai modalitas diagnostik, serta alur tatalaksana diagnostik dalam penegakan diagnosis leukemia akut.

### 2.1. Diagnosis dan klasifikasi leukemia akut berdasarkan WHO

Klasifikasi keganasan hematopoietik dan jaringan limfoid oleh WHO yang terakhir adalah klasifikasi tahun 2016, yang merupakan revisi terhadap klasifikasi sebelumnya di tahun 2001 dan 2008. Revisi ini dirasakan perlu seiring ditemukannya biomarker spesifik baru terkait neoplasma mieloid dan leukemia akut melalui pemeriksaan analisis genetik dan *next-generation sequencing* (NGS), yang meningkatkan kemampuan diagnosis dan berkaitan dengan prognosis. Klasifikasi ini menggabungkan fitur klinis, morfologi, imunofenotipe, sitogenetika, dan genetika molekuler untuk menentukan penyakit. Beberapa alasan yang menjadi dasar pertimbangan untuk revisi ini, antara lain (Arber *et al.*, 2016):

- Temuan molekuler yang baru telah memberikan perspektif baru mengenai penanda diagnostik dan prognostik dalam memahami patobiologi kelainan ini
- Makin baiknya karakterisasi dan standarisasi morfologi membantu diferensiasi kelompok penyakit, khususnya neoplasma mieloproliferatif BCR-ABL12 (MPNs), yang telah meningkatkan kehandalan dan reproduibilitas diagnosis.
- Sejumlah studi klinis-patologis telah memvalidasi postulat WHO dari pendekatan terpadu yang mencakup hematologi, morfologi, sitogenetika, dan temuan genetika molekuler.

Kriteria WHO untuk neoplasma mieloid dan leukemia akut ditampilkan pada Tabel 2.1 dan diagnosis *mixed phenotype acute leukemia* (MPAL) pada Tabel 2.2.

**Tabel 2.1.** Subtipe utama neoplasma mieloid dan leukemia akut menurut klasifikasi WHO 2016 (Arber *et al.*, 2016)

---

***Acute myeloid leukemia (AML) and related neoplasms***

***AML with recurrent genetic abnormalities***

*AML with t(8;21)(q22;q22.1);RUNX1-RUNX1T1*

*AML with inv(16)(p13.1q22) or t(16;16)(p13.1;q22);CBFB-MYH11*

*APL with PML-RARA*

*AML with t(9;11)(p21.3;q23.3);MLLT3-KMT2A*

*AML with t(6;9)(p23;q23.3);DEK-NUP214*

*AML with inv(3)(q21.3q26) or t(3;3)(q21.3;q26.2); GATA1, MECOM*

*AML (megakaryoblastic) with t(1;22)(p13.3;q13.3);RBM15-MKL1*

*Provisional entity: AML with BCR-ABL1*

*AML with mutated NPM1*

*AML with biallelic mutations of CEBPA*

*Provisional entity: AML with mutated RUNX1*

***AML with myelodysplasia-related changes***

***Therapy-related myeloid neoplasms***

***AML, NOS***

*AML with minimal differentiation*

*AML without maturation*

---

---

*AML with maturation*  
*Acute myelomonocytic leukemia*  
*Acute monoblastic/ monocytic leukemia*  
*Pure erythroid leukemia*  
*Acute megakaryoblastic leukemia*  
*Acute basophilic leukemia*  
*Acute panmyelosis with myelofibrosis*

**Myeloid sarcoma**

**Myeloid proliferations related to Down Syndrome**

*Transient abnormal myelopoiesis (TAM)*  
*Myeloid leukemia associated with Down Syndrome*

**Blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm**

**Acute leukemias of ambiguous lineage**

*Acute undifferentiated leukemia*  
*Mixed phenotype acute leukemia (MPAL) with t(9;22)(q34.1;q11.2);BCR-ABL1*  
*MPAL with t(v;11q23.3);KMT2A rearranged*  
*MPAL, B/ myeloid, NOS*  
*MPAL, T/ myeloid, NOS*

**B-lymphoblastic leukemia/lymphoma**

*B-lymphoblastic leukemia/ lymphoma, NOS*  
*B-lymphoblastic leukemia/ lymphoma with recurrent genetic abnormalities*  
*B-lymphoblastic leukemia/ lymphoma with t(9;22)(q34.1;q11.2);BCR-ABL1*  
*B-lymphoblastic leukemia/ lymphoma with t(v;11q23.3);KMT2A rearranged*  
*B-lymphoblastic leukemia/ lymphoma with t(12;21)(p13.2;q22.1);ETV6-RUNX1*  
*B-lymphoblastic leukemia/ lymphoma with hyperdiploidy*  
*B-lymphoblastic leukemia/ lymphoma with hypodiploidy*  
*B-lymphoblastic leukemia/ lymphoma with t(5;14)(q31.1;q32.3); IL3-IGH*  
*B-lymphoblastic leukemia/ lymphoma with t(1;19)(q23;p13.3).TCF3-PBX1*  
*Provisional entity: B-lymphoblastic leukemia/ lymphoma, BCR-ABL1-like*  
*Provisional entity: B-lymphoblastic leukemia/ lymphoma with iAMP21*

**T-lymphoblastic leukemia/lymphoma**

*Provisional entity: Early T-cell precursor lymphoblastic leukemia*  
*Provisional entity: Natural killer (NK) cell lymphoblastic leukemia/ lymphoma*

---

**Tabel 2.2.** Kriteria penilaian untuk diagnosis *Mixed Phenotype Acute Leukemia* (MPAL) (Arber *et al.*, 2016)

---

***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  $\epsilon$  chain)*

*or*

*Surface CD3*

***B-lineage***

*Strong CD10 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*

---

### **2.1.1. *Acute myeloid leukemia* (AML) dengan kelainan genetik berulang**

*World Health Organization* mendefinisikan subtype ini sebagai penyakit leukemia mieloid akut spesifik dengan berfokus pada subkelompok kelainan sitogenetik dan genetik molekuler yang signifikan. Sejumlah besar kelainan sitogenetik yang berulang telah ditemukan pada AML, dan sebagian besar termasuk dalam klasifikasi yang jarang terjadi. Sedikit penyempurnaan terkait pembaruan nama gen (seperti perubahan MLL menjadi KMT2A) disertakan, serta penegasan bahwa  $\text{inv}(3)(\text{q}21.3\text{q}26.2)$  atau  $\text{t}(3;3)(\text{q}21.3;\text{q}26.2)$  tidak mewakili gen fusi melainkan reposisi *enhancer* GATA2 distal yang mengaktifkan ekspresi MECOM dan secara bersamaan menyebabkan haploinsufisiensi GATA2. Untuk menekankan pentingnya fusi PML-RARA, yang mungkin tidak tampak atau merupakan hasil dari *rearrangement* kompleks sitogenetik selain  $\text{t}(15;17)(\text{q}24.1;\text{q}21.2)$ , leukemia promielositik akut (*acute promyelocytic leukemia*/APL) dengan fusi ini diubah

namanya menjadi APL dengan PML-RARA. Kategori baru AML dengan BCR-ABL1 ditambahkan untuk mengenali kasus AML *de novo* langka yang mungkin mendapat manfaat dari terapi TKI (*tyrosine kinase inhibitor*), meskipun sulit membedakan diagnosis antara AML *de novo* dengan BCR-ABL1, dan transformasi blastik CML tanpa informasi klinis yang memadai (Arber *et al.*, 2016).

Penelitian pendahuluan menunjukkan bahwa delesi gen reseptor antigen (IGH, TCR), IKZF1 dan/atau CDKN2A mendukung diagnosis penyakit *de novo* vs CML krisis blastik, sementara klasifikasi WHO berupaya untuk memasukkan temuan mutasi gen terbaru pada kasus AML. Perbaikan prognosis dikaitkan dengan AML dengan mutasi gen CEBPA bialelik, bukan mutasi gen tunggal (Arber *et al.*, 2016; Bain *et al.*, 2019).

Mutasi NPM1 dan mutasi CEBPA bialelik dalam klasifikasi terbaru menggantikan klasifikasi displasia *multilineage* pada AML tanpa kelainan sitogenetik terkait MDS yang kurang signifikan secara prognostik. Kategori AML dengan mutasi RUNX1 telah ditambahkan ke dalam klasifikasi kasus AML *de novo* dan mutasi ini tidak berhubungan dengan kelainan sitogenetik terkait MDS. Kategori penyakit ini tampaknya mempunyai prognosis yang lebih buruk daripada jenis AML lainnya (Arbei *et al.*, 2016; Kansal, 2019).

### **2.1.2. Acute myeloid leukemia dengan perubahan terkait mielodisplasia**

Kategori AML terkait mielodisplasia tetap dipertahankan, tetapi disempurnakan untuk mengakomodasi kasus dengan gambaran yang menunjukkan prognosis yang buruk. Apabila didapatkan mutasi NPM1 atau mutasi CEBPA bialelik, adanya displasia *multilineage* saja tidak dapat mengklasifikasikan kasus sebagai AML dengan perubahan terkait mielodisplasia. Dalam

kasus yang tidak memiliki mutasi ini, deteksi morfologis displasia *multilineage* (didefinisikan sebagai adanya 50% atau lebih sel displastik pada setidaknya 2 galur sel) tetap merupakan indikator prognostik yang buruk dan cukup untuk membuat diagnosis AML terkait mielodisplasia. Riwayat MDS tetap diperlukan untuk kategori ini seperti halnya adanya kelainan sitogenetik terkait MDS dengan pengecualian del(9q). Delesi ini telah dikeluarkan dari kelainan sitogenetik untuk AML dengan perubahan terkait mielodisplasia karena hubungannya dengan NPM1 atau mutasi CEBPA bialelik (Arbei *et al.*, 2016; Bain *et al.*, 2019). Klasifikasi lengkap ditunjukkan pada Tabel 2.3.

**Tabel 2.3.** Abnormalitas sitogenetik untuk mendiagnosis AML dengan perubahan terkait mielodisplasia jika dijumpai  $\geq 20\%$  blas di perifer atau sumsum tulang dan terapi sebelumnya telah disingkirkan. (Arbei *et al.*, 2016)

---

**Kelainan sitogenetik**

---

**Kariotipe kompleks (3 or lebih kelainan)**

***Unbalanced abnormalities***

-7 / del(7q)

del(5q) / t(5q)

i(17q) / t(17p)

-13 / del(13q)

del(11q)

del(12p) / t(12p)

idic(X)(q13)

***Balanced abnormalities***

t(11;16)(q23.3;p13.3)

t(3;21)(q26.2;q22.1)

t(1;3)(p36.3;q21.2)

t(2;11)(p21;q23.3)

t(5;12)(q32;p13.2)

t(5;7)(q32;q11.2)

t(5;17)(q32;p13.2)

t(5;10)(q32;q21.2)

t(3;5)(q25.3;q35.1)

---

### 2.1.3. Neoplasma mieloid terkait terapi

Neoplasma mieloid terkait terapi (t-MNs) tetap sebagai kategori tersendiri dalam klasifikasi untuk pasien yang menderita neoplasma mieloid setelah terapi sitotoksik. Neoplasma mieloid terkait terapi dapat dibagi menjadi MDS atau AML terkait terapi (t-MDS atau t-AML), tetapi kelainan sitogenetik terkait harus diidentifikasi dalam diagnosis akhir. Sejumlah kasus t-MN telah terbukti memiliki mutasi *germline* pada gen yang bersifat rentan kanker; riwayat keluarga diperlukan untuk mengungkap kerentanan kanker pada penderita t-MN (Tabel 2.4) (Arber *et al.*, 2016).

**Tabel 2.4.** Klasifikasi neoplasma mieloid dengan predisposisi *germline*. (Arber *et al.*, 2016)

---

<b><i>Myeloid neoplasms with germ line predisposition without a preexisting disorder or organ dysfunction</i></b>
<i>AML with germ line CEBPA mutation</i>
<i>Myeloid neoplasms with germ line DDX41 mutation*</i>
<b><i>Myeloid neoplasms with germ line predisposition and preexisting platelet disorders</i></b>
<i>Myeloid neoplasms with germ line RUNX1 mutation*</i>
<i>Myeloid neoplasms with germ line ANKRD26 mutation*</i>
<i>Myeloid neoplasms with germ line ETV6 mutation*</i>
<b><i>Myeloid neoplasms with germ line predisposition and other organ dysfunction</i></b>
<i>Myeloid neoplasms with germ line GATA2 mutation</i>
<i>Myeloid neoplasms associated with BM failure syndromes</i>
<i>Myeloid neoplasms associated with telomere biology disorders</i>
<i>JMML associated with neurofibromatosis, Noonan syndrome or Noonan syndrome-like disorders</i>
<i>Myeloid neoplasms associated with Down syndrome*</i>

---

#### **2.1.4. *Acute myeloid leukemia, not otherwise specified***

Subkategori AML *not otherwise specified* (NOS) tidak memiliki signifikansi prognostik jika kasus diklasifikasikan berdasarkan mutasi NPM1 dan status mutasi CEBPA bialelik. WHO memutuskan untuk mempertahankan subkategori AML, NOS dengan hanya satu perubahan: subkategori leukemia akut eritroid, tipe eritroid/mieloid (sebelumnya didefinisikan sebagai kasus dengan prekursor eritroid  $\geq 50\%$  dan mieloblas  $\geq 20\%$  di antara sel non-eritroid di sumsum tulang) telah dikeluarkan dari kategori AML. Dalam klasifikasi baru, mieloblas dihitung sebagai persentase dari total sel sumsum tulang; sebagian besar kasus tersebut memiliki total sel blas  $< 20\%$  dan sekarang diklasifikasikan sebagai MDS (biasanya MDS dengan *excess blasts*). Perubahan ini didasarkan pada hubungan yang erat antara leukemia eritroid akut tipe eritroid/mieloid dengan MDS dalam hal presentasi klinis, gambaran morfologis, dan kelainan genetik, serta rendahnya jumlah sel blas non-eritroid. Kasus dengan  $\geq 50\%$  atau lebih sel eritroid dan  $\geq 20\%$  total mieloblas biasanya memenuhi kriteria dan didiagnosis sebagai AML terkait mielodisplasia; kasus dengan total mieloblas  $\geq 20\%$  yang tidak memenuhi kriteria untuk AML terkait mielodisplasia atau AML dengan kelainan genetik berulang harus dikategorikan sebagai satu dari subtipe AML lainnya, yaitu NOS. Leukemia eritroid murni tetap sebagai subtipe AML-NOS dan sekarang menjadi satu-satunya jenis leukemia eritroid akut (Arber *et al.*, 2016; Kansal *et al.*, 2020). Perubahan kategori ini ditunjukkan pada Tabel 2.5.



**Tabel 2.5.** Pendekatan Diagnostik untuk Neoplasma Mieloid ketika Prekursor Eritroid meliputi  $\geq 50\%$  Sel Berinti di Sumsum Tulang (Arber *et al.*, 2016)

<b>BM erythroid precursors</b>	<b>Myeloblast % of all cells in BM (or PB)</b>	<b>Prior therapy?</b>	<b>Recurring WHO genetic abnormality?</b>	<b>Meets criteria for AMI-MRC?</b>	<b>Fourth edition diagnosis</b>	<b>Update fourth edition diagnosis</b>
$\geq 50\%$	N/A	Yes	N/A	N/A	Therapy-related myeloid neoplasm	Therapy-related myeloid neoplasm
$\geq 50\%$	$\geq 20\%$	No	Yes	N/A	AML with recurring genetic abnormality	AML recurring genetic abnormality
$\geq 50\%$	$\geq 20\%$	No	No	Yes	AML with myelodysplasia related changes	AML with myelodysplasia related changes
$\geq 50\%$	$\geq 20\%$	No	No	No	AML, NOS, acute erythroid leukemia (erythroid/myeloid subtype)	AML, NOS (non erythroid subtype)
$\geq 50\%$	$< 20\%$ , but $\geq 20\%$	No	No*	N/A	AML, NOS, acute erythroid leukemia	MDS+

<b>≥50%</b>	nonerythroid cells <20%, and <20% of nonerythroid cells	No	No*	NA	(erythroid/myeloid type) MDS+	MDS+
<b>&gt;80% immature erythroid precursors with ≥30% proerythroblasts</b>	<20%	No	No*	NA	AML, NOS, acute erythroid leukemia (pure erythroid type)	AML, NOS, acute erythroid leukemia (pure erythroid type)

*AML-MRC, acute myeloid leukemia with myelodysplasia-related changes; NA, not applicable.*

*\*Cases of AML t(8;21)(q22;q22.1);RUNX1-RUNX1T1, AML with inv(16)(p13.1q22) or t(16;16)(p13.1;q22);CBFB-MYH11 or APL with PML-RARA, may rarely occur in this setting with, 20% blasts and those diagnoses would take precedence over a diagnosis of AML, NOS, or MDS.*

*†Classify based on myeloblast percentage of all BM cells and of PB leukocytes and other MDS criteria.*

### **2.1.5. Sarkoma mieloid**

Sarkoma mieloid tetap dalam klasifikasi sebagai presentasi klinis yang unik dari setiap sub tipe AML. Sarkoma mieloid dapat muncul secara *de novo*, melibatkan sumsum tulang atau darah perifer, dapat muncul sebagai AML yang relaps, atau dapat muncul sebagai perkembangan dari MDS, MPN, atau MDS/MPN sebelumnya. Kasus sarkoma mieloid tanpa keterlibatan penyakit di sumsum tulang harus diselidiki lebih komprehensif sampai dapat diklasifikasikan ke dalam sub tipe AML yang lebih spesifik (Arber *et al.*, 2016).

### **2.1.6. Proliferasi mieloid pada sindrom Down**

Proliferasi mieloid pada sindrom Down termasuk *transient abnormal myelopoiesis* (TAM) dan leukemia mieloid yang berhubungan dengan sindrom Down. Pada kedua kondisi tersebut biasanya terjadi proliferasi megakarioblas: TAM terjadi saat lahir atau dalam beberapa hari kelahiran dan sembuh dalam 1 sampai 2 bulan, sedangkan leukemia mieloid terjadi lebih lambat, biasanya dalam 3 tahun pertama kehidupan dengan atau tanpa TAM sebelumnya dan menetap jika tidak diobati. Neoplasma mieloid pada sindrom Down memiliki kemiripan yang tidak tergantung pada jumlah sel blas dan tidak disubklasifikasikan menjadi MDS atau AML. Baik TAM dan leukemia mieloid yang terkait dengan sindrom Down dicirikan oleh mutasi GATA1 dan mutasi jalur JAK-STAT, dengan mutasi tambahan yang diidentifikasi pada kasus leukemia mieloid (Arber *et al.*, 2016).

### **2.1.7. Leukemia akut galur ambigu**

Tidak ada entitas baru dalam subkelompok leukemia akut ini. Pada penelitian pendahuluan didapatkan bahwa leukemia akut

fenotipe campuran (*mixed phenotype acute leukemia*/MPAL) dengan t(9;22) dapat berespons baik terhadap pengobatan TKI. Penanda galur tertentu yang berguna untuk mendefinisikan MPAL tidak berubah (Tabel 2.2), tetapi dalam klasifikasi baru ditekankan bahwa dalam kasus dimana dimungkinkan untuk menentukan 2 populasi blas yang berbeda, tidak harus ditemukan penanda spesifik, tetapi dapat memenuhi definisi baik untuk leukemia B, T, atau mieloid. Demikian pula kasus ALL atau AML yang tidak mengarah pada diagnosis MPAL, maka tidak perlu memenuhi kriteria MPAL yang lebih ketat untuk menetapkan galur; kriteria ini tidak berlaku secara universal untuk diagnosis AML atau ALL, tetapi hanya untuk MPAL. Sekarang juga diakui bahwa beberapa kasus B-ALL tipikal dengan ekspresi homogen penanda limfoid pada populasi blas tunggal dapat mengekspresikan mieloperoksidase tingkat rendah menggunakan metode imunofenotiping tanpa adanya diferensiasi mieloid. Oleh karena signifikansi klinis temuan ini belum ditetapkan, disarankan agar berhati-hati sebelum membuat diagnosis MPAL B/*myeloid*. Flowsitometri multiparameter adalah metode pilihan untuk diagnosis MPAL. Jika ada dua populasi yang tidak dapat dipisahkan secara jelas, sebagian besar kasus MPAL akan menunjukkan heterogenitas ekspresi beberapa antigen sehingga ekspresi MPO akan diekspresikan pada subset blas yang menunjukkan ekspresi penanda mieloid yang relatif lebih terang dan intensitas yang lebih rendah pada sel B (Arber *et al.*, 2016).

### **2.1.8. Leukemia/limfoma limfoblastik sel B (B-ALL)**

Dua entitas baru sementara yang penting dengan kelainan genetik berulang telah diakui dan dimasukkan ke dalam klasifikasi. Selain itu, klasifikasi B-ALL hipodiploid menjadi perhatian karena

hubungan unik antara *ALL* hipodiploid rendah dan mutasi TP53 (Arber *et al.*, 2016).

### **2.1.9. B-ALL dengan amplifikasi intrakromosomal kromosom 21**

Leukemia ini ditandai dengan amplifikasi sebagian kromosom 21, yang dideteksi oleh FISH dengan pemeriksaan untuk gen *RUNX1* yang mengungkapkan 5 atau lebih salinan gen (atau 3 atau lebih salinan tambahan pada satu kromosom 21 abnormal pada metafase FISH). Kelainan ini ditemukan pada sekitar 2% anak dengan *ALL*, terutama anak berusia lebih tua dengan jumlah leukosit rendah, serta jarang terjadi pada orang dewasa. Entitas baru ini dikaitkan dengan prognosis buruk yang sampai batas tertentu dapat diatasi dengan terapi yang lebih agresif (Arber *et al.*, 2016).

### **2.1.10. B-ALL dengan translokasi yang melibatkan tirosin kinase atau reseptor sitokin (“*BCR-ABL1-like ALL*”)**

Entitas yang baru diakui ini dianggap penting karena hubungannya dengan prognosis buruk dan respons beberapa kasus terhadap terapi TKI, namun sulit untuk didefinisikan dalam aturan klinis. Pertama kali dilaporkan secara terpisah oleh kelompok yang berbeda yang menunjukkan serangkaian kasus *ALL* anak dengan prognosis buruk dan profil ekspresi gen yang mirip dengan yang terlihat pada kasus *ALL* dengan *BCR-ABL1*. Fitur umum dari *BCR-ABL1-like ALL* meliputi translokasi yang melibatkan tirosin kinase lain, atau translokasi alternatif yang melibatkan faktor seperti reseptor sitokin 2 (*CRLF2*) atau, yang lebih jarang, penataan ulang yang mengarah pada pemotongan dan aktivasi reseptor eritropoietin (*EPOR*). Kasus dengan translokasi *CRLF2* sering dikaitkan dengan mutasi gen *JAK* dan

sangat umum pada anak-anak dengan sindrom Down. Translokasi ini menghasilkan upregulasi produk gen reseptor limfopoietin stroma timosit (TSLPR) dari CRLF2 pada sel leukemia yang dapat dengan mudah dideteksi oleh flowsitometri.

Kasus dengan translokasi yang melibatkan gen tirosin kinase melibatkan banyak gen yang berbeda termasuk ABL1 (dengan pasangan selain BCR), serta kinase lain termasuk ABL2, PDGFRB, NTRK3, TYK2, CSF1R, dan JAK2. Lebih dari 30 gen pasangan yang berbeda telah dilaporkan. Beberapa pasien, terutama mereka dengan translokasi EBF1-PDGFRB, telah menunjukkan respons yang luar biasa terhadap terapi TKI, bahkan setelah gagal terapi konvensional. Pasien dengan BCR-ABL1-*like* ALL menunjukkan frekuensi tinggi hilangnya IKZF1 dan CDKN2A/B, tetapi delesi ini juga terjadi pada frekuensi tinggi pada jenis ALL lainnya (Arber *et al.*, 2016).

### **2.1.11. Leukemia/limfoma limfoblastik sel-T (T-ALL)**

Proliferasi limfoblastik T indolen merupakan entitas non-neoplastik mirip limfoma limfoblastik T yang lebih mudah dikenali. Kondisi ini biasanya melibatkan jaringan limfoid saluran aerodigestif bagian atas tetapi dapat terjadi di lokasi lain. Kekambuhan lokal sering terjadi dan penyebaran sistemik jarang terjadi. Pemeriksaan histologik kelenjar getah bening yang terlibat menunjukkan infiltrasi dan kadang-kadang penggantian oleh proliferasi limfoblas yang kurang atipikal secara sitologi dibandingkan limfoma limfoblastik T umumnya. Meskipun sel blas memiliki fenotipe timus imatur yang dapat ditunjukkan dengan pewarnaan TdT pada kelenjar getah bening, fenotipenya mencerminkan perkembangan normal, fenotipe tidak menyimpang dan proliferasi tidak klonal. Ciri-ciri terakhir ini memungkinkan entitas ini dibedakan dari limfoma limfoblastik T.

*Early T-precursor* (ETP) ALL memiliki imunofenotipe unik dan susunan genetik yang menunjukkan terbatasnya diferensiasi sel T awal, dengan retensi beberapa karakteristik mieloid dan sel induk pada tingkat imunofenotipik dan genetik. Menurut definisi, blas ETP ALL mengekspresikan CD7 tetapi kurang mengekspresikan CD1a dan CD8, dan positif untuk 1 atau lebih penanda mieloid/sel induk CD34, CD117, HLADR, CD13, CD33, CD11b, atau CD65. Blas ETP ALL biasanya juga mengekspresikan CD2 dan CD3 sitoplasma dan mungkin mengekspresikan CD4, tetapi ini tidak termasuk definisi. Ekspresi CD5 sering negatif dan bila positif terdapat pada 75% populasi blas. Mutasi gen terkait mieloid, seperti FLT3, NRAS/KRAS, DNMT3A, IDH1, dan IDH2, dilaporkan pada frekuensi tinggi pada ETP ALL, sedangkan mutasi terkait T-ALL yang lebih tipikal seperti mutasi pada NOTCH1 atau mutasi pada CDKN1/2 jarang ditemukan (Arber *et al.*, 2016).

## **2.2. Beberapa rekomendasi untuk leukemia akut**

### ***2.2.1. Acute myeloid leukemia in adult patients: ESMO clinical practice guidelines for diagnosis, treatment, and follow-up***

Rekomendasi *European Society for Medical Oncology* (ESMO) menyebutkan bahwa pada pasien dengan kecurigaan AML harus dilakukan pemeriksaan sitogenetik dan molekular untuk stratifikasi risiko dan strategi terapi. Sangat penting untuk membedakan antara APL dari AML tipe lain dengan sitomorfologi (promielosit displastik, *binucleated blast*, sel *faggot*), tanda hiperfibrinolisis dan bukti fusi molekular yaitu fusi PML-RARA. Diagnosis AML ditegakkan bila jumlah sel blas mieloid  $\geq$  20% dari 500 sel sumsum tulang. Sel blas yang dihitung harus meliputi mieloblas, monoblas/promonosit, dan megakarioblas,

tetapi bukan monosit abnormal. Riwayat penyakit dahulu harus dikaji untuk menemukan adanya riwayat penyakit sumsum tulang terdahulu dan riwayat paparan terhadap radiasi, kemoterapi, atau toksin leukemogenik seperti benzena dan insektisida organoklorin. Hasil pemeriksaan darah lengkap sebelum diagnosis AML harus dikerjakan, walaupun hasil ini tidak cukup untuk membuat diagnosis definitif MRC-AML (AML dengan perubahan sitogenetik mielodisplasia). Diagnosis MRC-AML ditegakkan dengan adanya riwayat sindrom mielodisplastik (MDS), neoplasma mielodisplastik/ mieloproliferatif, ditemukannya abnormalitas sitogenetik terkait MDS, atau  $\geq 50\%$  sel displastik dari  $\geq 2$  lini (kecuali jika bersamaan dengan mutasi NPM1 atau CEBPA bialelik). Sitomorfologi masih menjadi baku emas untuk diagnosis displasia dan MDS, walaupun sudah ada perkembangan imunofenotiping yang mampu mengenali displasia melalui pola flowsitometri aberan.

*European Society for Medical Oncology* merekomendasikan penegakan diagnosis dengan pemeriksaan aspirasi sumsum tulang untuk pemeriksaan sitologi dan sitokimia, meliputi pulasan *Sudan Black B*, *myeloperoxidase*, dan esterase, imunofenotiping dan biopsi *trephine*. Biopsi sumsum tulang wajib dilakukan pada pasien dengan *dry tap*. Ditemukannya abnormalitas genetik rekuren terkait AML (seperti t(8:21)) dapat menyingkirkan ketidakpastian morfologik. *Multiparameter flow cytometry* (MFC) menggunakan minimal 6 warna dan mengikuti protokol *flow cytometry* seperti kriteria *European LeukemiaNet* (ELN) untuk klasifikasi imunofenotipik leukemia, diperlukan untuk diagnosis tertentu seperti *mixed phenotyped acute leukemia* (MPAL), *AML not otherwise specified* (NOS) dengan diferensiasi minimal, leukemia megakarioblastik akut atau neoplasma sel dendritik plasmaitoid



blastik (*BPDCN* yang positif untuk CD4, CD56, CD123, dan TCL1).

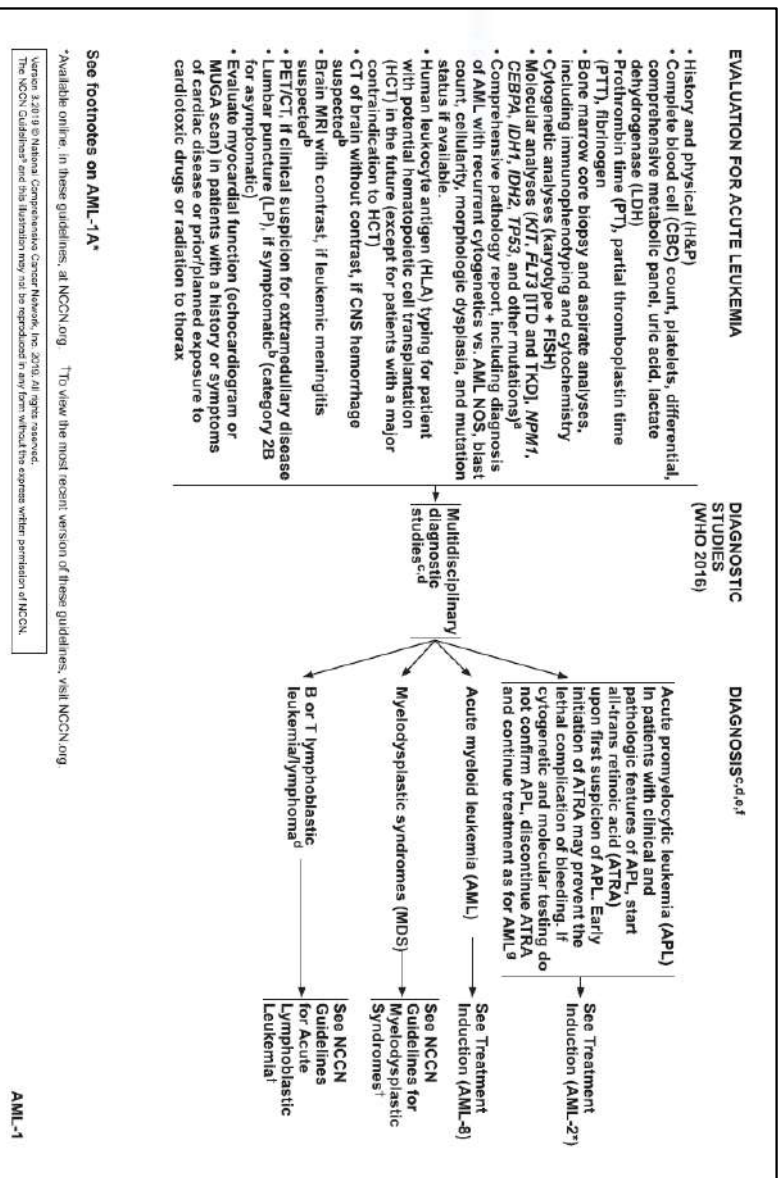
Klasifikasi sitogenetik harus berdasarkan evaluasi minimal 20 metafase. *Clone* abnormal dilaporkan hanya jika paling tidak 2 dari 20 sel teridentifikasi membawa abnormalitas kariotipik yang sama. Kelainan kriptik yang signifikan secara klinis (*MLL/KMT2A*, *inv(16)*, penyimpangan kromosom 3) bisa tidak terdeteksi dengan analisis kariotipik, sehingga analisa *fluorescent in situ hybridization* (FISH) komplementer direkomendasikan, dan wajib dilakukan seandainya analisa sitogenetik konvensional gagal.

Studi molekuler untuk mendeteksi mutasi gen *FLT3* (*internal tandem duplication/ITD* atau *domain tyrosine kinase/TKD*) harus dilakukan segera agar inisiasi terapi inhibitor *FLT3* dapat dilakukan sesegera mungkin. Studi molekuler lain untuk mengukur *FLT3-ITD allelic ratio* (AR), dan deteksi mutasi *NPM1*, *PML-RARA*, *RUNX1-RUNX1T1*, *CBFB-MYH11* dan mutasi *CEBPA* bialelik harus dilakukan saat diagnosis mengingat signifikansi dalam prognosis. Pasien dengan mutasi *TP53*, *RUNX1*, dan *ASXL1* dimasukkan dalam kelompok risiko *adverse* oleh ELN, dan disarankan untuk pemeriksaan lebih lanjut. Perlu dilakukan pemeriksaan terhadap mutasi pada *IDH1* dan *IDH2*, untuk mengidentifikasi pasien yang mungkin mendapat manfaat dari terapi inhibitor farmakologis. Jika memungkinkan, NGS terhadap panel gen yang sering mengalami mutasi pada AML dapat memberikan informasi tambahan terkait prognosis dan terapi.

### **2.2.2. *Acute myeloid leukemia, version 3.2019, NCCN Clinical Practice Guidelines In Oncology***

Pemeriksaan awal pada terduga AML terdiri dari anamnesis riwayat medis komprehensif dan pemeriksaan fisik. Pemeriksaan

laboratorium meliputi panel metabolik komprehensif dan pemeriksaan darah lengkap (trombosit, hitung jenis leukosit). Asam urat serum dan *lactate dehydrogenase* (LDH) memiliki relevansi prognostik dan harus dievaluasi. *Core biopsy* dan analisa aspirat sumsum tulang (imunofenotiping dan sitokimia) dan analisa sitogenetik (kariotiping dengan FISH) diperlukan untuk stratifikasi risiko dan panduan terapi AML. Mutasi gen tertentu, seperti KIT, FLT3-ITD, FLT3-TKD, NPM1, CEBPA, IDH1/IDH2, RUNX1, ASXL1, dan TP53, berkaitan dengan prognosis spesifik pada subset pasien dan mempengaruhi keputusan terapi. Mutasi gen tersebut harus diperiksa pada semua pasien; panel gen *multiplex* dan analisis NGS harus dilakukan untuk penilaian prognosis yang lebih komprehensif. Sebagai contoh, status mutasi FLT3 harus didapatkan sesegera mungkin agar dapat ditambahkan terapi inhibitor FLT3 (*midostaurin*) di hari ke-8 kemoterapi intensif. Sediaan sumsum tulang yang adekuat untuk pemeriksaan molekuler harus tersedia pada waktu diagnosis. Konsultasi dengan spesialis patologi harus dilakukan untuk mendiskusikan cara optimal pengumpulan dan preservasi sampel. Jika pemeriksaan molekuler tidak tersedia pada fasilitas kesehatan pasien, evaluasi di laboratorium luar atau rujukan ke institusi lain direkomendasikan sebelum melakukan evaluasi sumsum. Sel blas leukemik yang bersirkulasi dalam darah perifer dapat menjadi alternatif untuk deteksi kelainan molekuler pasien.



Gambar 2.1. Rekomendasi evaluasi leukemia akut (NCCN, 2019)

Presentasi ekstramedular jarang terjadi pada pasien dengan AML, namun jika terdapat kecurigaan penyakit ekstramedular, direkomendasikan untuk pemeriksaan PET/CT *scan*. Pasien dengan tanda atau gejala sistem saraf pusat harus dievaluasi dengan teknik *imaging* yang sesuai, seperti radiografi, CT, atau MRI untuk deteksi perdarahan intrakranial, penyakit leptomeningeal, atau lesi massa di otak atau sumsum tulang belakang. Skrining rutin pungsi lumbal (LP) tidak diwajibkan pada saat diagnosis AML, namun jika gejala menetap dan perdarahan atau massa/lesi telah dieksklusi, pasien harus menjalani pungsi lumbal untuk diagnosis dan terapeutik setelah koagulopati dikoreksi, tersedia transfusi trombosit adekuat, dan penyakit sirkulasi telah teratasi melalui inisiasi terapi sistemik. Penapisan dengan pemeriksaan pungsi lumbal harus dipertimbangkan pada pasien dengan diferensiasi monositik, MPAL, leukosit > 40.000/uL saat diagnosis, APL, atau penyakit ekstramedular, terutama pada pasien yang tidak mendapatkan terapi *cytarabine* dosis tinggi (HiDAC).

Koagulopati seringkali ditemukan pada berbagai leukemia, sehingga direkomendasikan untuk dilakukan skrining koagulopati dengan mengevaluasi *prothrombin time*, *partial thromboplastin time*, dan aktivitas fibrinogen sebagai bagian dari evaluasi awal dan sebelum melakukan prosedur invasif apapun. Perlu tidaknya evaluasi jantung (ekokardiografi) ditentukan berdasarkan faktor risiko individual. Ekokardiografi harus dilakukan pada pasien dengan riwayat atau gejala penyakit jantung, riwayat atau rencana terapi dengan obat kardiotoksin atau radiasi toraks, atau berusia lanjut. Pada pasien usia muda yang asimtomatik dan tanpa riwayat penyakit jantung, ekokardiografi dapat dipertimbangkan.

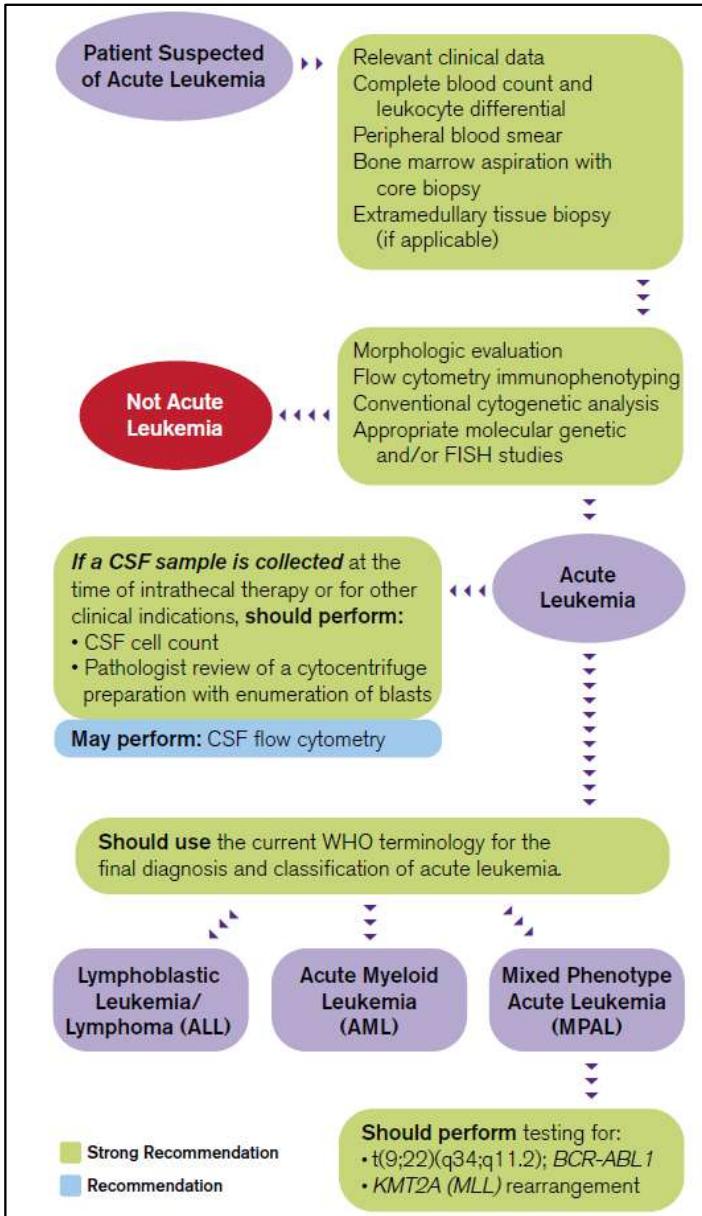
*Human leukocyte antigen (HLA) typing* harus dilakukan pada semua pasien baru terdiagnosis AML yang dipertimbangkan

untuk transplantasi sel hematopoietik (HCT). HLA typing pada anggota keluarga direkomendasikan pada pasien berusia hingga 80 tahun, yang tidak memiliki risiko sitogenetik yang baik, dan *typing* jaringan harus diperluas untuk melibatkan pencarian donor alternatif. Pada pasien dengan risiko sitogenetik buruk, pencarian donor harus dimulai saat pasien masih menjalani kemoterapi induksi, tidak menunggu remisi tercapai. Pada pasien dengan risiko sitogenetik buruk direkomendasikan untuk dilakukan rujukan dini ke pusat transplantasi.

Diagnosis AML ditegakkan berdasarkan temuan  $\geq 20\%$  blas di sumsum tulang atau darah perifer. Pada kondisi klinis tertentu, diagnosis AML dapat dibuat meskipun sel blas  $< 20\%$  pada pasien dengan abnormalitas sitogenetik rekuren meliputi t(15;17), t(8;21), t(16;16), atau inv(16). Klasifikasi akurat AML memerlukan studi diagnostik multidisiplin dengan pemeriksaan imunohistokimia, sitokimia, dan analisa genetik molekuler. Beberapa kasus dapat menunjukkan bukti ekspresi antigen mieloid dan limfoid pada sel leukemik dan digolongkan sebagai leukemia akut galur ambigu. Leukemia jenis ini kemudian dikelompokkan lagi menjadi, *acute undifferentiated leukemia*, MPAL dengan *rearrangement BCR-ABL1*, MPAL dengan *rearranged KMT2A*, MPAL dengan sel B/fitur mieloid yang tidak terklasifikasi, dan MPAL dengan sel T/fitur mieloid yang tidak terklasifikasi. Ekspresi dari dua karakteristik sitokimiawi dan/atau imunofenotipik dari kedua galur pada satu sel didefinisikan sebagai *biphenotypic*, sedangkan ekspresi karakteristik spesifik galur pada populasi sel leukemik yang berbeda didefinisikan sebagai *bilineal*.

### ***2.2.3. Initial diagnostic workup of acute leukemia, guidelines by College of American Pathologists and American Society of Hematology***

Informasi klinis dasar seperti usia dan jenis kelamin pasien, penting untuk diketahui karena berkaitan dengan prognosis pada leukemia akut. Pada ALL, anak berusia 1-9 tahun umumnya memiliki luaran yang lebih baik dibandingkan pasien berusia <1 tahun atau >10 tahun. Pada AML, pasien berusia 60 tahun atau lebih memiliki luaran yang lebih buruk dibandingkan pasien yang lebih muda. Selain itu, jenis kelamin juga merupakan faktor prognosis pada pasien leukemia akut. Pada anak dengan ALL, pasien laki-laki memiliki prognosis yang lebih buruk dibandingkan pasien perempuan, walaupun perbedaan ini tidak begitu signifikan pada pasien ALL dewasa. Pasien AML laki-laki juga memiliki prognosis yang lebih buruk dibandingkan pasien perempuan.



**Gambar 2.2.** Alur Diagnostik Penderita Leukemia Akut (Arber, 2017)

Beberapa sindrom predisposisi dengan mutasi *germline* dimasukkan ke revisi terbaru WHO *Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*. Beberapa yang paling sering ditemukan yaitu AML dengan mutasi CEBPA, neoplasma mieloid atau limfoid dengan mutasi RUNX1, neoplasma mieloid atau limfoid dengan mutasi ANKRD26, dan neoplasma mieloid dengan mutasi GATA2. Riwayat keluarga dengan AML, ALL, MDS, trombositopenia persisten, kecenderungan perdarahan klinis, imunodefisiensi, atau malignansi hematologis pada usia muda adalah petunjuk penting terhadap leukemia akut dengan predisposisi *germline*.

Neoplasma mieloid terkait terapi, salah satunya *therapy-related* AML (t-AML) adalah komplikasi lanjutan dari kemoterapi sitotoksik dan/atau radioterapi terhadap penyakit neoplastik atau non neoplastik terdahulu. Saat ini sekitar 15-20% dari seluruh kasus AML adalah t-AML, dengan insidensi yang semakin meningkat seiring meningkatnya jumlah pasien kanker yang *survive* dari terapi. Kasus *therapy-related lymphoblastic leukemia* telah dilaporkan, sebagian besar dianggap terjadi karena adanya mutasi yang dipicu oleh terapi sitotoksik. Namun mekanisme dan jalur yang terlibat masih belum diketahui secara pasti. Mayoritas pasien yang mendapatkan terapi sitotoksik tidak mengalami t-AML, sehingga mungkin terdapat faktor predisposisi genetik lainnya. Riwayat terapi sitotoksik pada pasien dengan t-AML atau *therapy-related lymphoblastic leukemia* penting untuk diagnosis, klasifikasi, dan identifikasi predisposisi turun-temurun terhadap kanker *drug-induced*.

Riwayat terapi radiasi, baik monoterapi atau kombinasi dengan kemoterapi untuk kondisi neoplastik atau non-neoplastik terdahulu, berkaitan dengan peningkatan risiko terjadinya leukemia akut, terutama AML. Paparan radiasi setelah prosedur



diagnostik, misalnya *CT scan* pada anak, meningkatkan risiko terjadinya leukemia.

### **2.3. Modalitas pemeriksaan pada leukemia akut**

Untuk melakukan diagnosis leukemia akut dapat dimulai dari pemeriksaan sederhana seperti pemeriksaan hematologi sebagai uji penapis awal sebelum melakukan pemeriksaan morfologi sel atau pemeriksaan lain. Berdasarkan morfologi sel blas yang ditemukan, leukemia akut umumnya dikategorikan ke dalam leukemia limfoblastik akut prekursor sel B atau T (B-/T-ALL) dan AML, dan jarang ditemukan leukemia akut dengan jenis *bilineage*. Terapi pasien leukemia akut ditentukan berdasarkan pada diagnosis/klasifikasi penyakit tersebut. Selain berdasarkan pada morfologi sel, pemeriksaan tambahan hampir selalu diperlukan untuk mengklasifikasikan leukemia akut dengan tepat, meliputi imunofenotiping dengan flowsitometri, sitokimia, sitogenetika, dan pemeriksaan molekuler (Koeppen, 2011; Bain, 2017).

#### **2.3.1. Hematology analyzer**

Uji penapis awal untuk mendiagnosis AML dilakukan dengan *hematology analyzer* yang dapat melakukan pemeriksaan jumlah eritrosit, jumlah leukosit, jumlah trombosit, hemoglobin, hematokrit, dan hitung jenis leukosit beserta turunannya. Pada umumnya pada kasus AML dijumpai jumlah leukosit meningkat, dan jumlah trombosit menurun. Meskipun jarang, beberapa kasus bisa mempunyai jumlah sel trombosit normal (Paraskevas, 2004; Molnar, 2020).

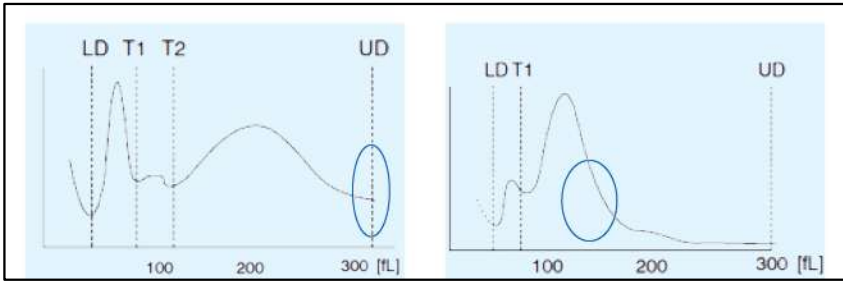
Teknologi *hematology analyzer* juga dapat mengukur jumlah tipe sel khusus seperti leukosit imatur, *normoblast*, atau *nucleated red blood cells* (NRBC), dan retikulosit. Hasil pemeriksaan dengan *hematology analyzer* selain jumlah dan persentasi sel, juga dilengkapi dengan

histogram dan *scattergram* yang dapat memberikan informasi mengenai faktor interferensi yang mungkin terjadi saat pemeriksaan. Pada *white blood cell (WBC) channel*, reagen pelisis khusus dapat menyebabkan sel leukosit menyusut, sehingga sel leukosit dapat dihitung dan diukur secara volumetrik secara impedans. Pada histogram WBC partikel dengan ukuran sekitar 35 sampai 90 fL dianggap limfosit; partikel antara 90 dan 160 fL dianggap mononuklear (monosit, blas, granulosit yang belum matang, dan limfosit reaktif); dan partikel antara 160 dan 450 fL dianggap granulosit (Molnar, 2020).

### **2.3.1.1. Histogram leukosit**

Histogram leukosit menggambarkan sebaran dari hitung jenis leukosit yang terbagi menjadi 3 kelompok sel (neutrofil, limfosit, dan campuran antara eosinofil, monosit, basofil). Dengan menambahkan reagen *sulfolyzer* akan melisiskan sel eritrosit dan juga melisiskan leukosit secara parsial, sehingga menyebabkan sel menyusut ke volume yang ditetapkan sesuai dengan jenis sel dan disajikan secara terpisah sehingga didapatkan populasi dalam histogram. Setelah dilisiskan sel-sel akan ditampilkan dalam histogram menurut ukuran sel (Sysmex, WBC Histogram, 2011) Reagen ini melisiskan sel dengan reaksi sitokimia yang mengakibatkan sitoplasma sel kolaps.

Hubungan antara kasus leukemia yang sering ditemukan dengan jumlah sel leukosit yang tinggi perlu dicermati apabila ditemukan *flagging WU (white blood cell upper discriminator)*.

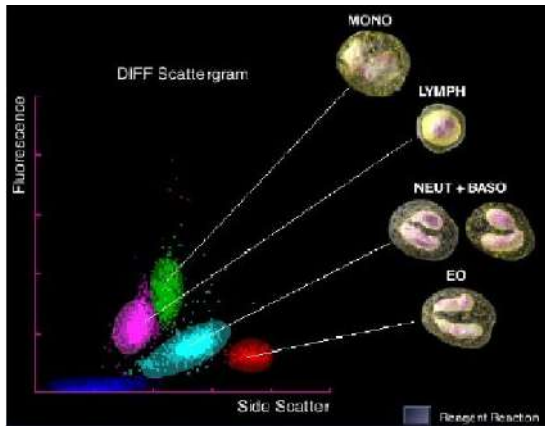


**Gambar 2.3.** Histogram leukosit *flagging* WU (Sysmex, 2011).

Pada Gambar 2.3, histogram leukosit dengan *flagging* WU (*white blood cell upper discriminator*) akan didapatkan bila terdapat jumlah leukosit yang sangat tinggi (leukosit  $> 100 \times 10^3 \mu\text{L}$ ). Sampel sebaiknya diencerkan dengan ratio 5:1 sampai dengan didapatkan jumlah yang dapat terhitung (Sysmex, 2011).

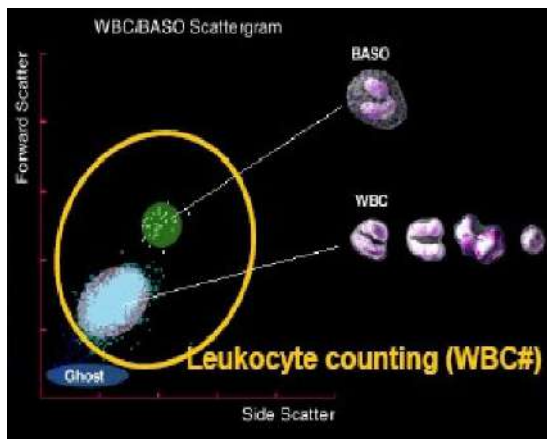
### 2.3.1.2. *Scattergram* hitung jenis leukosit

*Hematology analyzer* dengan teknologi terkini dapat mengklasifikasi hitung jenis leukosit menjadi 6 kelompok sel yaitu basofil, eosinofil, neutrofil, limfosit, dan monosit, serta dapat melaporkan adanya granulosit imatur (IG%). Pemeriksaan tersebut melalui tiga *channel* analisis leukosit yaitu *WBC 4 part differential channel*, *WBC/baso channel*, dan *IMI channel* (Sysmex. XE-5000, 2011) (Gambar 2.4).



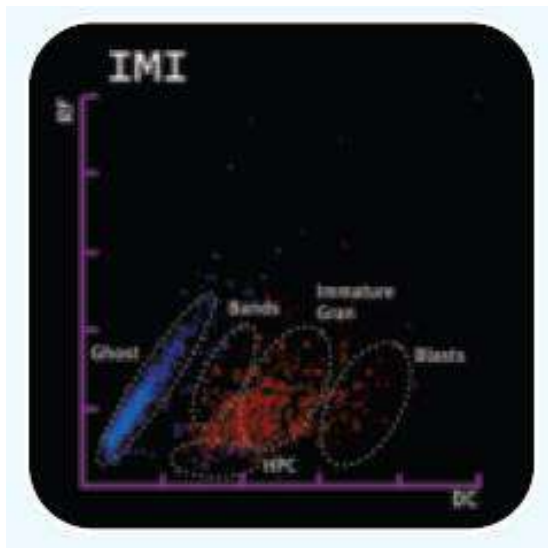
**Gambar 2.4.** Scattergram *WBC 4 part differential channel* (Sysmex, 2011)

Pada *WBC 4 part differential channel* menggunakan reagen pelisis eritrosit yang juga bereaksi pada membran leukosit. Reagen tersebut menyebabkan reagen pewarna fluoresens dapat masuk ke dalam sel sehingga mewarnai DNA dan RNA di dalam sel. Berdasarkan data dari *side scatter* serta pendaran fluoresensi akan didapatkan empat populasi leukosit yaitu limfosit, monosit, eosinofil, dan granulosit lain (neutrofil dan basofil).



**Gambar 2.5.** Scattergram *WBC/baso channel* (Sysmex, 2011)

*WBC/baso channel* menggunakan pelisis eritrosit, leukosit non basofil dan secara selektif menghalangi degranulasi basofil serta membran basofil sehingga basofil terpisah dari bentuk-bentuk leukosit lainnya. Berdasarkan data *forward* dan *side scatter* akan didapatkan jumlah leukosit non basofil dan jumlah basofil. Pada *scattergram* tampak *ghost* yang merupakan sel eritrosit yang mengalami deformitas (Gambar 2.5).



**Gambar 2.6. Scattergram IMI channel XE-5000 (Sysmex, 2011)**

*Immature myeloid information (IMI) channel* menggunakan pelisis eritrosit dan secara selektif melindungi sel imatur serta menyebabkan nukleus leukosit non imatur menjadi terpapar. Analisis *IMI channel* dilakukan dengan metode *DC/RF* impedansi dan data yang diperoleh adalah granulosit imatur (Gambar 2.6).

*Scattergram* pada berbagai alat *hematology analyzer* dengan berbagai modifikasi alat untuk deteksi sel imatur, dapat digunakan sebagai alat bantu skrining dalam membedakan berbagai kondisi reaktif dan neoplastik. Analisis pola *scattergram* juga dapat

membedakan antara leukemia akut dan kronis. Pola plot tersebut selanjutnya digunakan sebagai uji penapis awal diagnosis sementara sehingga dapat dilanjutkan dengan pemeriksaan molekuler dan sitogenetik. Pola ini dapat juga dikonfirmasi dengan penilaian morfologi dari pemeriksaan darah tepi dan sumsum tulang, serta dapat digunakan dalam memantau kasus pasca terapi, dalam keadaan remisi atau *relaps*, sehingga analisis *scattergram* untuk skrining awal leukemia akut dan kronis di laboratorium dengan sarana terbatas atau jumlah sampel yang besar dan pemeriksaan lebih lanjut dapat dipercepat (Shin S, 2017; Ningombam, 2021).

### **2.3.2. Morfologi sel**

Klasifikasi WHO saat ini untuk AML mencakup empat kategori utama: AML dengan kelainan genetik, AML dengan mielodisplasia, keganasan mieloid terkait terapi, dan AML *not otherwise specified* (NOS). Diagnosis awal AML-NOS biasanya berdasarkan pada fitur morfologi dan derajat maturasi serta diferensiasi, sesuai klasifikasi French-American-British (FAB). Klasifikasi yang lebih definitif menggunakan kriteria WHO dengan pemeriksaan molekuler dan sitogenetik (Koeppen H, 2011).

Sesuai kriteria WHO, diagnosis AML ditetapkan bila jumlah sel blas pada darah tepi atau sumsum tulang lebih dari 20%. Jika salah satu kelainan genetik dapat dibuktikan, diagnosis AML dapat ditegakkan tanpa melihat jumlah sel blas. Pada sumsum tulang yang mengandung >50% progenitor eritroid, persentase sel blas dihitung berdasarkan jumlah sel non-eritroid, hal ini penting untuk menegakkan diagnosis leukemia eritroid akut (Koeppen, 2011).

Pada kasus kasus AML, sel blas diklasifikasikan sebagai mieloblas, monoblas, eritroblas, atau megakarioblas, dengan tiga jenis (I-III) sel blas seri mieloid. Sel promielosit dan promonosit dianggap sebagai "ekuivalen" sel blas dalam kasus dengan kelainan sitogenetik t(15;17) dan AML dengan diferensiasi monositik, dan perlu dimasukkan dalam jumlah sel blas keseluruhan (Koeppen, 2011).

### **2.3.2.1. Biopsi dan apusan aspirasi sumsum tulang**

Biopsi sumsum tulang pasien dengan AML biasanya menunjukkan gambaran sumsum hiperseluler dengan penggantian sel hematopoiesis normal oleh sel blas dalam derajat yang bervariasi. Diperkirakan 5% kasus AML dewasa memberikan gambaran sumsum tulang hiposelular (<30% selularitas). Pada banyak kasus, sel blas ditemukan dengan bentuk yang relatif sama, populasi monoton dengan ukuran sel kecil atau sedang berbentuk bulat atau oval, kadang-kadang menjorok atau berlekuk, nukleus dengan nukleolus yang jelas, dan ukuran sitoplasma yang bervariasi. Gambaran sitologi sel mieloblas pada apusan aspirasi sumsum tulang bervariasi dalam hal ukuran sel, lebar sitoplasma, dan bentuk nukleus. Sering ditemukan sel blas dengan kromatin inti yang jelas dan memiliki satu atau beberapa nukleolus. Salah satu ciri khas mieloblas pada AML adalah adanya Auer *rod*, yang merupakan agregat azurofilik dari granular, yang banyak ditemukan pada AML dengan kelainan sitogenetik t(15;17)(q22;q12) atau t(8;21)(q22;q22) (Koeppen, 2011).

Monoblas, rata-rata berukuran lebih besar dari mieloblas dan memiliki inti bulat/oval, atau kadang-kadang tampak terlipat, kromatin inti tersebar halus, nukleolus agak menonjol, dan sitoplasma biasanya basofilik berukuran besar sedang atau besar. Sering ditemukan granula sitoplasma azurofilik yang halus

dan/atau vakuola pada sitoplasma. Promonosit mempunyai gambaran sedikit basofilik atau amfofilik, kadang sitoplasma bervakuola, dan lobulasi atau lipatan nukleus lebih menonjol daripada sel monoblas. Eritroblas memiliki sitoplasma granular yang sangat basofilik; sitoplasma agranular kadang tampak bervakuola, mempunyai inti bulat dengan kromatin padat dan nukleolus. Morfologi megakarioblas sangat bervariasi, mulai dari sel berukuran kecil yang tidak berdiferensiasi hingga sel dengan sitoplasma besar yang dengan pseudopodi atau *bleb*. Pada biopsi kasus leukemia megakarioblastik dapat terjadi fibrosis retikulin yang menyebabkan *dry tap* pada aspirasi sumsum tulang, sehingga diperlukan pemeriksaan imunohistokimia (IHK) untuk membantu menetapkan diagnosis (Koeppen, 2011).

Pada proses pematangan elemen hematopoietik, perlu diperhatikan tanda displasia atau fitur morfologi terkait kelainan sitogenetik. Displasia granulositik bermanifestasi sebagai sel hipogranular, atau sel dengan inti hiposegmentasi (*pseudo-Pelger-Huët*), atau *pseudo-Chédiak-Higashi* dengan *giant* granula. Displasia pada sel megakariosit tampak seperti sel megakariosit bentuk kecil dengan inti hipolobulasi (mikromegakariosit). Kriteria morfologi diseritropoiesis adalah disinkroni iregular bentuk nuklearsitoplasma, multinuklear, vakuolisasi sitoplasma, atau *aberrant positive* pada pewarnaan *periodic acid-Schiff* (PAS). Pada kasus *acute promyelocytic leukemia* (APL) dengan kelainan  $t(15;17)(q22;q12)$  dapat ditemukan sel promielosit atipikal yang ditandai dengan granula khas dan mungkin mengandung banyak Auer *rods* (varian hipergranular). Variian mikrogranular menunjukkan sel dengan inti bilobi atau inti terlipat disertai granula sitoplasma yang jarang.

Leukemia mieloid akut dengan *inv(16)*, (*p13q22*) atau  $t(16;16)(p13;q22)$  ditandai oleh dominasi sel eosinofil, dan granula



berwarna ungu terutama pada promielosit atau mielosit. Jumlah absolut eosinofil dapat meningkat atau dalam batas normal. Karakteristik morfologi AML dengan  $t(8;21)(q22;q22)$  tampak pada neutrofil dan prekursor neutrofilik termasuk sitoplasma yang berwarna orange kemerahan, inti dengan bentuk *pseudo-Pelger-Huët*, dan granula *pseudo-Chédiak-Higashi* (Koeppen, 2011).

### 2.3.2.2. Sitokimia

Pemeriksaan sitokimia dapat membantu diagnosis leukemia akut dengan melihat hasil pemeriksaan sitokimia positif pada sel *blast*. Reaksi sitokimia positif mieloperoksidase lebih dari 3% pada sel *blast* diinterpretasikan sebagai leukemia mieloid. Reaksi sitokimia untuk  $\alpha$ -*naphthyl butyrate* atau  $\alpha$ -*naphthyl acetate esterase* digunakan untuk menetapkan diferensiasi monositik. Reaksi mieloperoksidase negatif namun *butyrate* atau esterase non-spesifik reaktif, menunjukkan leukemia monositik akut. Pada leukemia yang berdiferensiasi minimal, sel blas kurang reaktif terhadap mieloperoksidase tetapi mengekspresikan antigen mieloid pada flowsitometri (Koeppen, 2011).

### 2.3.2.3. Imunohistokimia

Dalam upaya diagnosis laboratorium leukemia akut, pemeriksaan IHK dapat menjadi alternatif pemeriksaan jika sampel aspirasi sumsum tulang tidak representatif untuk mengevaluasi morfologi (hitung blas) atau untuk melihat fenotip dengan sitokimia atau flowsitometri. Proporsi sel blas di antara sel berinti dapat dipastikan dengan pewarnaan untuk CD34 dan CD117 karena sel blas memiliki ekspresi CD34 yang berkurang secara signifikan pada AML (Koeppen, 2011). Pemeriksaan imunohistokimia bermanfaat bila membutuhkan pemeriksaan

dengan sampel yang berasal dari kelenjar getah bening, spesimen biopsi, atau jaringan lain (Bain, 2017).

### 2.3.3. Flowsitometri

Sel leukemia maupun berbagai sel normal mengekspresikan antigen nuklear, sitoplasma, dan permukaan sel yang khas. Ini disebut imunofenotipe sel. Karakterisasi imunofenotipe disebut imunofenotiping dan dideteksi dengan cara melabel epitop spesifik antigen seluler dengan antibodi monoklonal, tetapi pada beberapa antigen dapat menggunakan antibodi poliklonal. Teknik yang digunakan untuk imunofenotiping biasanya adalah flowsitometri (Bain, 2017).

Imunofenotiping dengan flowsitometri saat ini merupakan pemeriksaan pilihan yang digunakan untuk diagnosis leukemia akut. Pada sebagian besar kasus leukemia akut (>90%), FCM akan secara tegas menentukan galur mieloid dan limfoid serta diferensiasi sel blas (monositik, eritroid, megakarioblastik). Deteksi sel imatur dengan flowsitometri tidak menggantikan pemeriksaan jumlah sel blas berdasarkan morfologi karena pemeriksaan flowsitometri tidak mewakili komposisi seluler sumsum tulang. *The European Group for the Immunological Characterisation of Leukemias* (EGIL) awalnya mengusulkan sistem skoring untuk mendiagnosis leukemia dengan fenotipe *bilineage*, tetapi telah direvisi pada klasifikasi WHO. Dalam sistem penilaian yang direvisi tersebut, ekspresi CD3 (sitoplasma/permukaan) menunjukkan galur limfoid T, CD19 dengan CD79a, CD22 (sitoplasma), atau CD10 menunjukkan galur limfoid B, dan ekspresi mieloperoksidase atau penanda monositik (NSE, CD14, CD64, CD11c, atau *lysozim*) menunjukkan galur mieloid (Koeppen, 2011).

#### 2.3.4. Pemeriksaan sitogenetik

Analisis genetik semakin penting dalam penatalaksanaan neoplasma hematologi dengan tujuan untuk identifikasi faktor etiologi, diagnosis dan klasifikasi, penentuan prognosis, dan identifikasi MRD. Analisis genetik terdiri atas sitogenetik konvensional, *fluorescence in situ hybridization* (FISH), analisis genetik molekuler DNA, dan analisis genetik *ribonucleic acid* (RNA). Kasus neoplasma hematologi sering diidentifikasi berkaitan dengan kelainan sitogenetik.

Pemeriksaan sitogenetik konvensional dilakukan secara mikroskopis pada kromosom sel saat metafase. Jika pemeriksaan aspirasi sumsum tulang gagal, tetapi jumlah sel blas tinggi di perifer dimungkinkan untuk melakukan analisis sitogenetik pada sel darah perifer.

#### 2.3.5. Pemeriksaan molekuler

Penatalaksanaan penderita dengan keganasan hematologi untuk tujuan diagnostik, pemantauan terapi, membuat prognosis yang akurat, dan memprediksi respons terhadap terapi dapat dilakukan dengan teknik molekuler. Pemeriksaan molekuler hematopatologis meliputi deteksi mutasi, *rearrangement* gen, dan kelainan kromosom untuk diagnosis dan prognosis, deteksi dan kuantifikasi *minimal residual disease* (MRD) untuk memantau terapi, deteksi mutasi pada kelainan hematologi bawaan, pengujian farmakogenetik untuk mendeteksi variasi genetik yang mempengaruhi terapi obat, dan identifikasi penyakit infeksi (Jackson, 2020).

Pemeriksaan molekuler menggunakan enzim dan proses replikasi DNA, sebagai contoh teknik *polymerase chain reaction* (PCR) yang membuat jutaan amplicon (kopi) dari urutan DNA yang akan diperiksa. Pembuatan DNA sintetik memerlukan

sekuens yang pendek sebagai primer atau *probe* untuk menemukan sekuens DNA atau RNA tertentu dalam populasi asam nukleat. Untuk deteksi mutasi dapat menggunakan metode amplifikasi alel, Sanger *sequencing*, dan kadang pemeriksaan analisis polimorfisme. *Messenger RNA* (mRNA) dan RNA ribosom juga dapat diamplifikasi melalui proses yang disebut *reverse transcriptase PCR* (RT-PCR). Pemeriksaan mRNA selain dapat mendeteksi adanya mutasi, juga dapat digunakan untuk memantau translokasi kromosom yang menghasilkan transkripsi mRNA *chimeric* baru. Pada penyakit hematologi berbasis genetik, dapat terjadi *sequence* varian tanpa mempengaruhi fungsi, sehingga variasi dalam urutan genetik dapat mengkode protein identik. *Single nucleotide polymorphisme* (SNPs) dapat dideteksi tetapi mungkin tidak terkait dengan penyakit/kelainan tertentu (Jackson, 2020).

## **2.4. Algoritme penggunaan flowsitometri pada leukemia akut di Indonesia**

### **2.4.1. Pendahuluan**

Hasil yang akurat, tepat, dan dapat diandalkan selalu menjadi isu penting di laboratorium tidak terkecuali pada bidang hematologi. Hal ini bahkan lebih dibutuhkan, karena masalah khusus yang berasal dari berbagai aspek praktik laboratorium diagnostik milenium ketiga, seperti (Zini et al., 2014):

- a. Pengenalan teknologi baru, sistem yang semakin kompleks dan instrumen otomatis
- b. Beban kerja yang semakin meningkat
- c. Kebutuhan untuk memperluas *good laboratory practice* (GLP) ke laboratorium di seluruh dunia dengan sumber daya keuangan dan teknologi yang terbatas

d. Pembaharuan nilai diagnostik dari beberapa metode terdahulu, seperti morfologi dan mikroskopis, yang membutuhkan tingkat standarisasi dan konsistensi yang lebih baik

Salah satu dampaknya adalah peran mikroskopis untuk identifikasi dan evaluasi sel dalam pemeriksaan diagnostik kelainan hematologi diperdebatkan secara berkala (Van't Veer & Haferlach, 2014). Diagnostik pada keganasan hematologi semakin berkembang dan membutuhkan keahlian lebih untuk mendapatkan hasil target terapi dan prognosis yang relevan. (Béné et al., 2015). Hal ini mendorong pengembangan standar internasional yang diperlukan untuk mencapai komparabilitas hasil analisis hematologi (Zini et al., 2014). Pada subtopik berikut, akan dibahas mengenai algoritme diagnosis leukemia yang merupakan salah satu keganasan di bidang hematologi yang sering kita jumpai dalam praktik sehari-hari.

#### **2.4.2. Peranan sitomorfologi pada leukemia**

Status mikroskop mengalami perubahan dari sebelumnya sebagai satu-satunya alat diagnostik menjadi salah satu alat diagnostik yang terintegrasi dengan metode lain, sesuai dengan pedoman dan penemuan terbaru (Béné et al., 2015). Terdapat dua sistem pengklasifikasian leukemia, yaitu sistem *French-American-British* (FAB) yang didasarkan pada morfologi untuk menentukan imunotipe spesifik, dan *World Health Organization* (WHO) berdasarkan translokasi kromosom dan bukti displasia (*American Cancer Society*, 2018).

##### **2.4.2.1 Klasifikasi berdasarkan FAB**

Berdasarkan morfologi dan pewarnaan sitokimia, sistem FAB mengklasifikasikan AML menjadi 8 subtipe (M0 – M7) dan ALL menjadi 3 subtipe (L1 – L3) (Tabel 2.6). Diferensiasi berdasarkan

morfologi meliputi ukuran sel, inti sel prominen, warna dan jumlah sel, serta penampakan sitoplasma (*American Cancer Society*, 2018).

**Tabel 2.6.** Klasifikasi leukemia berdasarkan FAB

<b>KATEGORI</b>	<b>NAMA</b>	<b>KETERANGAN</b>
ALL	L1	Small homogenous lymphoblast
	L2	Large heterogenous lymphoblast
	L3	Burkitt type
AML	M0	Acute myeloblastic leukemia, undifferentiated
	M1	Acute myeloblastic leukemia, without maturation
	M2	Acute myeloblastic leukemia, with maturation
	M3	Acute promyelocytic leukemia
	M4	Acute myelomonocytic leukemia
	M5	Acute monocytic leukemia
	M6	Erythroleukemia
M7	Acute megakaryoblastic leukemia	

Subtipe M0 hingga M5 ditemukan berasal dari leukosit imatur. *Acute myeloid leukemia* subtipe M6 terjadi pada eritrosit yang sangat imatur, sedangkan AML M7 ditemukan pada trombosit imatur (*American Cancer Society*, 2018).

#### **2.4.2.2 Klasifikasi berdasarkan WHO**

Sistem klasifikasi FAB dapat berguna, tetapi tidak memperhitungkan banyak faktor yang sekarang diketahui mempengaruhi prognosis pasien. Sistem klasifikasi WHO, revisi terakhir tahun 2016, mencakup beberapa faktor ini untuk mencoba mengklasifikasikan AML dengan lebih baik (*American Cancer Society*, 2018).

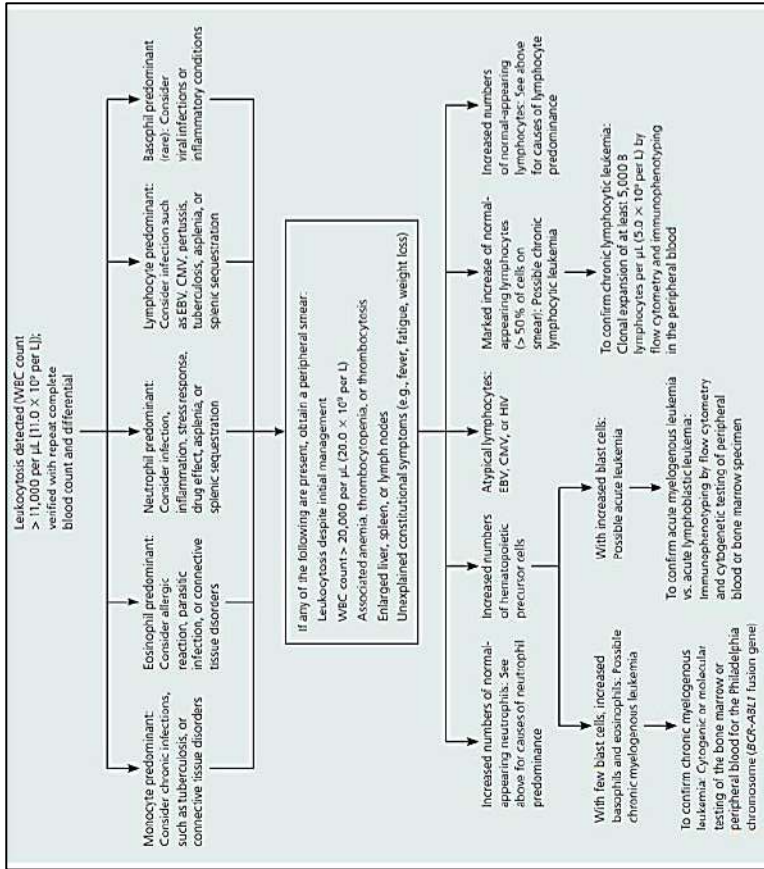
### 2.4.3. Diagnosis leukemia

Sebagai langkah awal, pemeriksaan darah lengkap harus dilakukan untuk membantu skrining leukemia atau jika terdapat kecurigaan leukemia. Leukositosis, seringkali  $> 100.000$  sel/ $\mu\text{L}$ , adalah temuan laboratorium yang khas pada CML dan CLL. Lebih dari 96% pasien dengan CML memiliki leukosit  $>20.000$  sel/ $\mu\text{L}$ , dibandingkan dengan hanya 34% hingga 38% pasien dengan AML atau ALL (Davis *et al.*, 2014).

Pada leukemia akut juga dapat ditemukan leukopenia, disertai dengan anemia atau trombositopenia. Tes laboratorium lain yang dapat dilakukan pada awal pemeriksaan termasuk elektrolit, kadar kreatinin, tes fungsi hati, dan tes koagulasi. Jika pasien tampak sakit atau demam, dokter harus mengevaluasi kemungkinan infeksi dengan urinalisis, kultur urin, kultur darah, dan foto toraks (Davis *et al.*, 2014).

Langkah diagnosis selanjutnya melibatkan evaluasi apusan darah tepi (EADT) dan biasanya sediaan aspirasi sumsum tulang. Gambar 2.7 merinci langkah awal dalam evaluasi kemungkinan leukemia. Ringkasan tes laboratorium yang umum digunakan untuk mengevaluasi leukemia tertera di Tabel 2.7.

**Gambar 2.7.** Algoritma untuk evaluasi kemungkinan leukemia (Davis et al., 2014);  
 CMV = *cytomegalovirus*; EBV = Epstein-Barr virus; HIV = *human immunodeficiency virus*; WBC = *white blood cell*)





**Tabel 2.7** Tes laboratorium umum untuk evaluasi leukemia

<b>Pemeriksaan</b>	<b>Aplikasi klinis</b>
Aspirasi atau biopsi sumsum tulang	Identifikasi sel blas pada AML dan ALL Luasnya keterlibatan sumsum berkaitan dengan prognosis CLL
Sitogenetik	Deteksi kromosom Philadelphia (BCR-ABL1 <i>fusion gene</i> ) untuk diagnosis CML Identifikasi kelainan untuk diagnosis sub tipe leukemia Memandu terapi
Imunofenotiping dengan flowsitometri	Menentukan prognosis Menghitung sel limfoid klonal untuk diagnosis CLL Identifikasi penanda permukaan untuk diagnosis sub tipe leukemia
Molekular (mendeteksi mutasi DNA spesifik)	Deteksi kromosom Philadelphia (BCR-ABL1 <i>fusion gene</i> ) untuk diagnosis CML Membantu diagnosis sub tipe leukemia Memandu terapi
Apusan darah tepi	Menentukan prognosis Identifikasi Auer <i>rods</i> pada AML, sel blas pada AML dan ALL

#### 2.4.4. Peran flowsitometri pada dugaan leukemia

Imunofenotiping dengan flowsitometri multiparameter merupakan bagian penting dari diagnosis terpadu pasien dengan dugaan keganasan hematologi, yang juga mencakup identifikasi morfologik/numerik kelainan hematopoietik serta investigasi sitogenetik dan molekuler. Penerapan metode untuk penegakan diagnosis bergantung pula pada informasi dari hasil laboratorium klinis dan pemeriksaan klinis (Zini *et al.*, 2014).

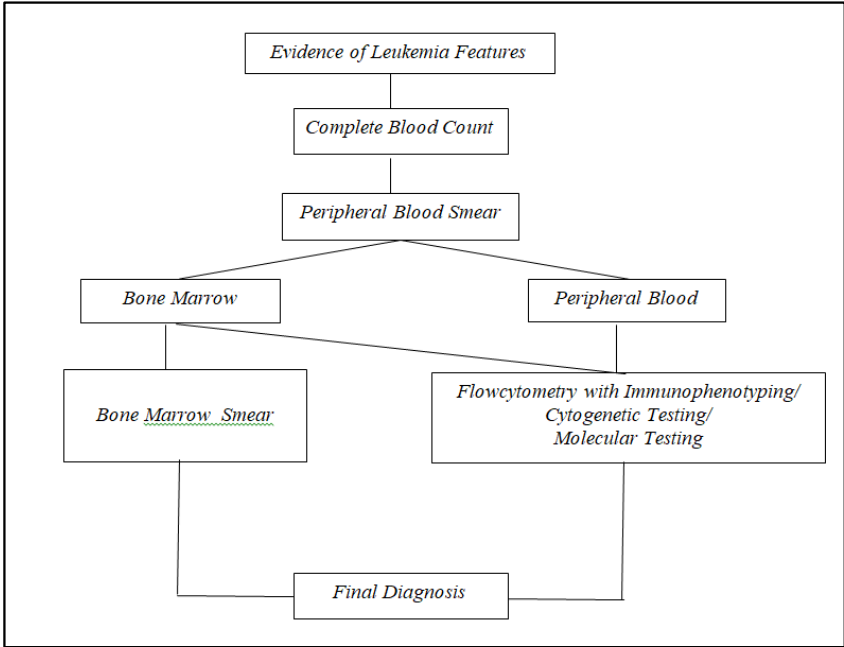
Pedoman dari *The International Council for Standardization in Hematology (ICSH)* mengenai “evaluasi flowsitometri pada pasien

dengan dugaan AML dan MDS” bertujuan untuk memberikan informasi terbaru bagi tenaga laboratorium dan klinisi. *Acute myeloid leukemia* dan *myelodysplasia syndrome* yang 'dicurigai' di sini dianggap sebagai sitopenia yang baru teridentifikasi, bukan AML atau MDS yang telah tegak diagnosis. Dengan demikian, pedoman ini memberikan informasi mengenai penerapan imunofenotiping pada alur diagnostik dan bagaimana mengambil keputusan tentang langkah diagnostik/terapi lebih lanjut dari hasil yang didapatkan (Zini et al., 2014).

Pada pasien dengan suspek MDS dan/atau AML, dua temuan utama yang dapat mengarah pada penerapan imunofenotiping adalah adanya sitopenia pada darah tepi, dan/atau kecurigaan adanya blas yang terdeteksi dengan pemeriksaan CBC atau EADT. Dengan demikian, langkah pertama adalah mencari peningkatan progenitor hematopoietik imatur dengan morfologi blas. Langkah berikutnya adalah mengevaluasi morfologi mieloid, eritroid, dan potensi maturasi trombosit. Penentuan hasil yang optimal tetap memerlukan analisis sediaan aspirasi sumsum tulang meskipun hasil EADT yang abnormal telah memberikan informasi penting (Zini et al., 2014).

#### **2.4.5. Algoritme diagnosis leukemia**

Diagnostik leukemia merupakan aplikasi gabungan dari beberapa metodologi yang berbeda, memungkinkan penentuan subklasifikasi, diagnosis dan parameter prognostik yang tepat.



**Gambar 2.8.** Alur diagnosis leukemia (Zini, 2014)

## Daftar Pustaka

American Cancer Society (ACS). (2018). Acute Myeloid Leukemia - Early Detection, Diagnosis, and Types. *American Cancer Society, August 2018*, 1–21. [www.cancer.org](http://www.cancer.org)

Arber DA, Borowitz MJ, Cessna M, Etzell J, Foucar K, Hasserjian RP, *et al.* Initial diagnostic workup of acute Leukemia guideline from the College of American pathologists and the American Society of Hematology. *Arch Pathol Lab Med.* 2017;141(10):1342–93.

Bain BJ, Béné MC. Morphological and Immunophenotypic Clues to the WHO Categories of Acute Myeloid Leukaemia. *Acta Haematol* 2019;141:232–244. DOI: 10.1159/000496097.

Bain B. Leukaemia Diagnosis. 5<sup>th</sup> Ed. India: Wiley Blackwell.2017. p. 69-134

Baum, H. (2019). *WHO-Klassifikation*. 127(20), 2508–2508. [https://doi.org/10.1007/978-3-662-48986-4\\_3316](https://doi.org/10.1007/978-3-662-48986-4_3316)

Béné, M. C., Grimwade, D., Haferlach, C., Haferlach, T., & Zini, G. (2015). Leukemia diagnosis: Today and tomorrow. *European Journal of Haematology*, 95(4), 365–373. <https://doi.org/10.1111/ejh.12603>

Davis, A. S., Viera, A. J., & Mead, M. D. (2014). Leukemia: An overview for primary care. *American Family Physician*, 89(9), 731–738.

Heuser M, Ofran Y, Boissel N, Brunet Mauri S, Craddock C, Janssen J, *et al*. Acute myeloid leukaemia in adult patients: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up†. *Ann Oncol* [Internet]. 2020;31(6):697–712. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.annonc.2020.02.018>

Jackson CL, Mehta S. Molecular Diagnosis in Hematopathology. Keohane EM, Otto CN, Walenga JM(Editors). In Rodak's: *Hematology Clinical Principles and Applications*. 6<sup>th</sup> Ed. 2020. p 495-524.

Kansal R. Toward Integrated Genomic Diagnosis in Routine Diagnostic Pathology by the World Health Organization Classification of Acute Myeloid Leukemia. *J Clin Haematol*. 2020 Volume 1, Issue 2. DOI: [10.33696/haematology.1.006](https://doi.org/10.33696/haematology.1.006)

Koeppen H, Ramos CEB, Konoplev S. Traditional Diagnostic Approaches. In Faderl S, Katarjian, editor.: *Leukemias: Principles and Practice of Therapy*; Willey-Blackwell. 2011

Molnar JA. Automated Blood Cell Analysis. Dalam: Rodak BF, editor. *Hematology Clinical Principles and Application*. 6<sup>th</sup> Ed. Elsevier Saunders. 2022. p. 174-200.

Ningombam A, Acharya S, Sarkar A, *et al*. Scattergram patterns of hematological malignancies on sysmex XN-series analyzer. 2021. *J.App.Hem* 12(2):83-9.

Paraskevas F. Clinical Flowcytometry. Dalam: *Wintrobe's Clinical Hematology*. 11<sup>th</sup> Ed. Philadelphia: Lippincot Williams and Wilkens; 2004. p. 99-107.

Sysmex. *WBC Histogram Interpretations of 3-Part Differentiation*. Insert Kit Brochure. 2011

Sysmex. XE-5000 Automated Hematology System. Insert Kit Brochure. 2011.

Shin S, Cho SR, Kim S, *et al*. Identification of cell morphology parameters from automatic hematology analyzers to predict the peripheral blood CD34-positive cell count after mobilization. 2017. *Plos One*. Doi:10.1371/journal.pone/0174286

Tallman MS, Wang ES, Altman JK, Appelbaum FR, Bhatt VR, Bixby D, *et al.* Acute myeloid leukemia, version 3.2019. *JNCCN J Natl Compr Cancer Netw.* 2019;17(6):721–49.

Van't Veer, M., & Haferlach, T. (2014). Should clinical hematologists put their microscopes on eBay? *Haematologica*, 99(10), 1533–1534. <https://doi.org/10.3324/haematol.2014.114710>

Zini, G., Kern, W., Brereton, M., & Stephens, A. D. (2014). ICSH: On board for new projects. *International Journal of Laboratory Hematology*, 36(3), 306–312. <https://doi.org/10.1111/ijlh.12232>

# BAB III

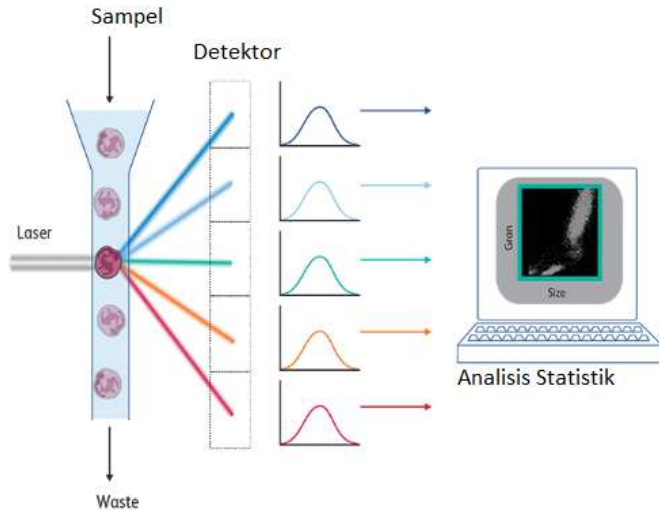
## DASAR-DASAR FLOWSITOMETRI

### 3.1. Pendahuluan

Sel sebagai satuan terkecil dari makhluk hidup mempunyai fungsi dan karakteristik khusus yang memungkinkan sel tersebut dikenali, misalnya ekspresi antigen baik di permukaan, sitoplasma, maupun inti sel. Salah satu metode untuk menilai karakteristik suatu sel adalah imunofenotiping.

Imunofenotiping adalah teknik yang didasarkan pada reaksi imunologi, menggunakan antibodi spesifik yang berlabel fluoresens. Antibodi spesifik tersebut akan berikatan dengan protein spesifik yang diekspresikan oleh sel dan dapat dideteksi dengan mendeteksi fluoresensi yang timbul pada saat zat fluoresens yang terikat itu tereksitasi oleh sinar laser. Salah satu teknologi yang kerap digunakan untuk tes ini adalah flowsitometri.

Flowsitometri adalah teknologi yang memungkinkan analisis sel tunggal dengan multi-parameter dalam waktu singkat. Flowsitometri terdiri dari tiga komponen utama yaitu sistem alir (*fluidic system*), sistem optik, dan sistem komputer/elektronik. Sistem alir bertujuan membuat sel yang akan melewati sinar laser pada poin interrogasi menjadi fokus, sehingga terbaca sel tunggal. Sistem optikal pada flowsitometri mengumpulkan informasi dari cahaya sebar (*scatter light*) dan cahaya yang diteruskan (*forward scatter*) untuk dianalisis. Sistem elektronik/komputer melakukan konversi sinyal yang ditangkap dari sistem optik menjadi data digital yang kemudian ditampilkan dalam grafik (Gambar 3.1) (Leach et al., 2013; McKinnon, 2018).



**Gambar 3.1.** Skema prinsip pemeriksaan flowsitometri (“Multicolor Flow Cytometry,” 2020).

Selama beberapa dekade flowsitometri telah berkembang pesat dan banyak diaplikasikan di berbagai bidang, salah satunya bidang medis. Saat ini, sistem laser yang umum digunakan dapat mendeteksi hingga 20 parameter (FSC, SSC, dan 18 jenis fluoresensi), beberapa instrumen bahkan memiliki kemampuan mendeteksi hingga 50 parameter. Saat ini juga banyak alat yang menggunakan *avalanche photodiodes* (APD) dibandingkan *photomultiplier* sehingga sensitivitas dan akurasi deteksi menjadi lebih baik.

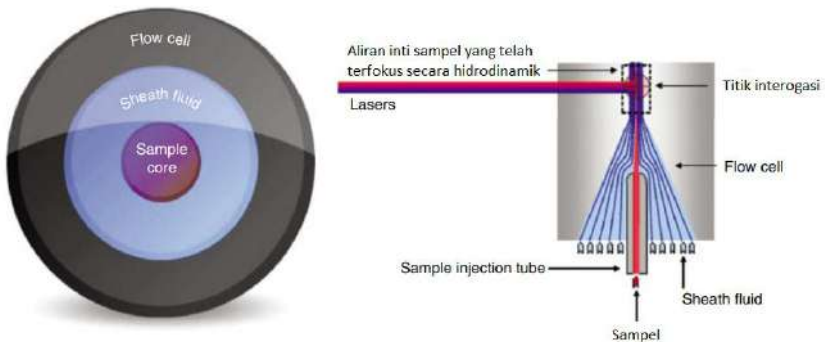
Selain perkembangan alat flowsitometri, parameter-parameter yang dapat digunakan untuk mendeteksi karakter sel pun berkembang. Oleh karena itu beragam strategi pendekatan dapat digunakan untuk menilai karakteristik suatu sel dalam populasi. Fluorokrom terkonjugasi yang digunakan juga berkembang sehingga memperluas spektrum kemampuan deteksi.



## 3.2. Prinsip flowsitometri

### 3.2.1. Sistem alir

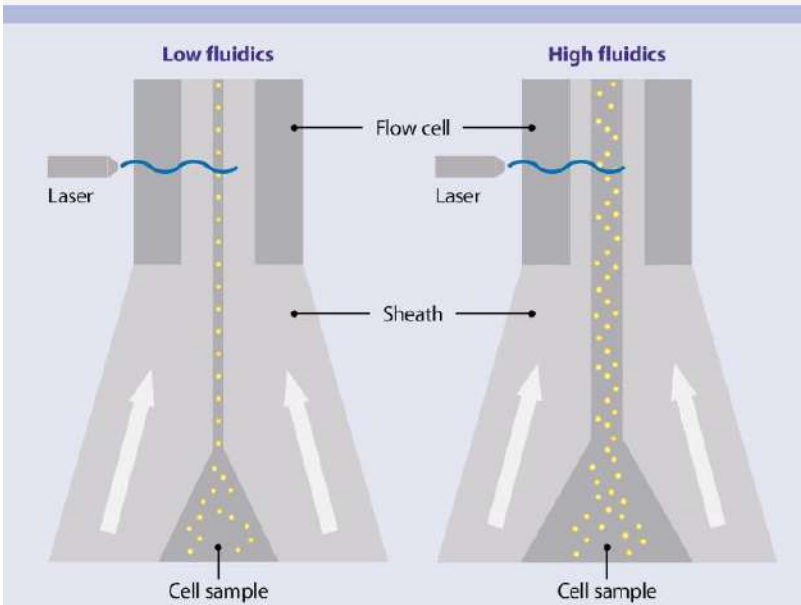
Prinsip dasar flowsitometri adalah kemampuannya untuk mengukur sifat suatu partikel individual pada saat partikel tersebut melalui satu atau lebih dari satu tembakan sinar laser. Sistem alir bertujuan untuk mengatur aliran sel dalam sampel sedemikian sehingga sel akan mengalir melewati jalur interogasi satu persatu. Dalam *flow cell*, cairan sampel diinjeksikan ke dalam aliran cairan selubung (*sheath fluid*). Perbedaan tekanan, kecepatan dan densitas kedua cairan ini akan mencegah terjadinya pencampuran antara keduanya, sehingga sampel akan mengalir dengan cairan selubung di bagian luarnya (Gambar 3.2) (Leach et al., 2013). Kecepatan aliran akan bertambah karena selubung menyempit. Sampel yang disuntikkan ke bagian tengah aliran tersebut akan mengalami pemusatan (*focusing*) sesuai efek Bernoulli, sehingga tercipta aliran partikel yang berbaris satu per satu (*hydrodynamic focusing*) (Gambar 3.2) (“Flowcytometry Basics Guide Practical Advice to Get You Started in Flow Cytometry,” 2020).



**Gambar 3.2.** Prinsip *hydrodynamic focusing* (Leach et al., 2013)

Pada kondisi optimal (aliran laminar), tidak terjadi pencampuran antara aliran cairan sentral dengan cairan selubung. Aliran partikel selanjutnya akan melewati sumber cahaya yang disebut sebagai titik interogasi (*interrogation point*) (“Flowcytometry Basics Guide Practical Advice to Get You Started in Flow Cytometry,” 2020).

Tekanan sampel selalu lebih tinggi dibandingkan dengan tekanan cairan selubung. Perubahan kecepatan injeksi suspensi sel ke tengah cairan selubung akan memengaruhi lebar aliran sampel dan jumlah sampel yang melewati titik interogasi. Makin besar tekanan sampel, aliran koaksial akan lebih lebar, sehingga kemungkinan sel melewati titik interogasi tidak pada posisi yang optimal (Gambar 3.3). Pengaturan kecepatan aliran harus disesuaikan dengan aplikasi, di mana untuk pemeriksaan dengan resolusi yang tinggi diperlukan kecepatan aliran injeksi yang lebih lambat (*low flow rate*). Sebagai contoh, untuk imunofenotiping leukemia dapat dilakukan akuisisi cepat dengan kecepatan aliran injeksi tinggi (*high flow rate*), namun untuk analisis DNA harus menggunakan *low flow rate* (Leach et al., 2013).



**Gambar 3.3.** Pengaruh kecepatan aliran injeksi (“Flow cytometry basics,” 2020)

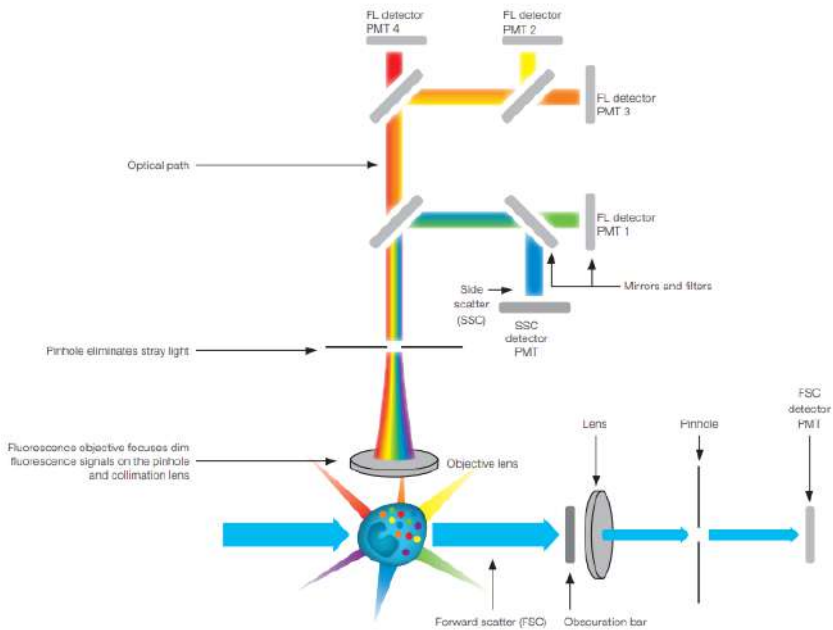
### 3.2.2. Sistem optik

Laser adalah sumber cahaya yang paling sering digunakan dalam flowsitometri. Laser menghasilkan cahaya dengan panjang gelombang tunggal (sinar laser) pada frekuensi spesifik. Terdapat laser dengan panjang gelombang berbeda dari kisaran *deep ultraviolet* (UV) sampai *infrared* (IR) dengan tingkat kekuatan yang bervariasi (*photon output/time* biasanya dalam satuan mW) (“Flowcytometry Basics Guide Practical Advice to Get You Started in Flow Cytometry,” 2020).

Setelah proses *hydrodynamic focusing*, partikel akan melewati titik interogasi yaitu satu atau lebih dari satu tembakan sinar laser. Pada saat ditembak sinar laser, partikel akan memendarkan cahaya (*light scattering*) atau melepaskan emisi fluoresensi dari fluorokrom yang melabel antibodi yang terikat padanya (“Flowcytometry Basics

Guide Practical Advice to Get You Started in Flow Cytometry,” 2020).

Sistem optik terdiri atas optik eksitasi (*excitation optics*) dan optik koleksi (*collection optics*). Optik eksitasi tersusun atas serangkaian lensa dan prisma yang bertujuan memfokuskan cahaya, sedangkan optik koleksi terdiri atas lensa, cermin, dan filter yang mengumpulkan dan mengarahkan cahaya yang terpendar ke detektor optik (*photomultiplier tube*/PMT atau *photodiode* (*avalanche photodiode*/APD)) yang spesifik (Gambar 3.4) (Leach et al., 2013).



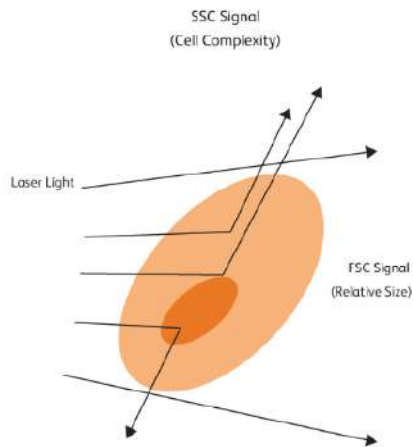
**Gambar 3.4.** Skema sistem optik flowsitometer (“Flow cytometry basics,” 2020)

### 3.2.2.1. Pendaran cahaya (*light scatter*)

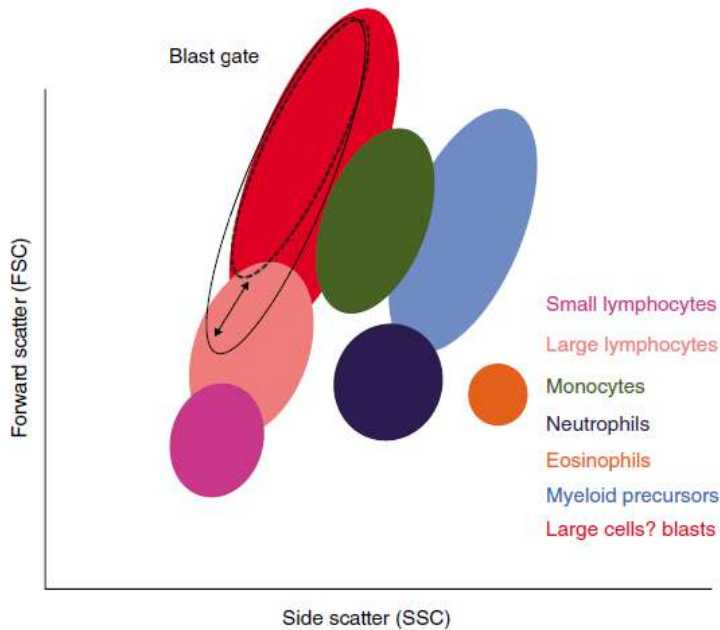
Pada saat sel melewati titik interogasi, cahaya dari sinar laser akan dipendarkan secara lurus dan pada sudut  $90^{\circ}$  (Gambar 3.5). Jumlah cahaya yang dipendarkan tergantung pada sifat fisik sel,

seperti ukuran sel, kompleksitas inti, dan granularitas sitoplasma. Sinyal cahaya pendaran ini dikumpulkan oleh detector spesifik, diubah menjadi sinyal digital dan ditampilkan sebagai *dot plot* untuk analisis (Leach et al., 2013).

Cahaya yang dibelokkan pada sudut lancip disebut *forward scattered light* (FSC), yang jumlahnya proporsional dengan luas permukaan atau ukuran sel. *Forward scattered light* dikumpulkan oleh detektor yang posisinya segaris dengan sinar laser pada sisi berlawanan dengan aliran sampel (Gambar 3.4). Sebagian cahaya akan melewati membran sel dan dipantulkan atau dibiaskan oleh organel sitoplasma atau inti sel. Cahaya ini dikumpulkan oleh detektor yang diletakkan pada posisi  $90^\circ$  terhadap cahaya laser (Gambar 3.4) dan disebut *side scattered light* (SSC). *Side scattered light* proporsional dengan granularitas atau kompleksitas internal sel (Gambar 3.5). Informasi mengenai sifat fisik sel memungkinkan diferensiasi sel dalam populasi yang heterogen seperti leukosit (Gambar 3.6) (Leach et al., 2013).



**Gambar 3.5.** *Forward scattered light* (FSC) dan *side scattered light* (SSC) (“Multicolor Flow Cytometry,” 2020)



**Gambar 3.6.** Diagram skematik diferensiasi leukosit darah tepi berdasarkan karakteristik FSC dan SSC (Leach et al., 2013)

### 3.2.2.2. Fluoresensi

Pengukuran fluoresensi yang dilakukan pada berbagai panjang gelombang dapat memberikan data kuantitatif dan kualitatif mengenai reseptor permukaan sel atau molekul intrasel seperti DNA dan sitokin (“Flowcytometry Basics Guide Practical Advice to Get You Started in Flow Cytometry,” n.d.), dengan menggunakan zat warna atau fluorokrom yang dapat berikatan langsung dengan sel atau ligand (seperti antibodi monoklonal). Zat warna atau fluorokrom akan tereksitasi oleh cahaya dengan panjang gelombang yang khas (*excitation wavelength*) untuk molekul tersebut dan melepaskan foton cahaya (emisi) yang menghasilkan fluoresensi dalam panjang gelombang tertentu (*emission wavelength*) yang lebih panjang dibandingkan dengan panjang gelombang eksitasi. Tabel 3.1. menunjukkan beberapa fluorokrom yang

paling sering digunakan dalam bidang flowsitometri (Leach et al., 2013).

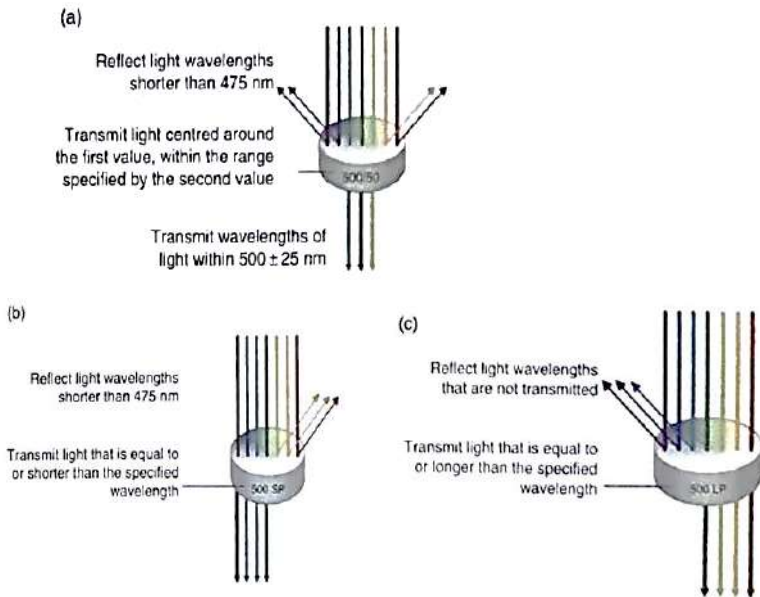
**Tabel 3.1.** Panjang gelombang eksitasi dan emisi maksimum untuk beberapa fluorokrom yang sering digunakan dalam flowsitometri (Leach et al., 2013)

<b>Fluorokrom</b>	<b>Singkatan</b>	<b>Eksitasi max (nm)</b>	<b>Emisi max (nm)</b>
<b>Cascade blue</b>		380, 401	419
<b>Cascade yellow</b>		399	549
<b>Pacific blue</b>		410	455
<b>Alexa 488*</b>		495	519
<b>Fluorescein isothiocyanate*</b>	FITC	494	519
<b>Phycoerythrin*</b>	PE	496, 546	578
<b>Texas red*</b>	ECD	595	615
<b>PE-cyanine 5*</b>	PC5/PE-Cy5	496, 546	667
<b>PE-cyanine 5.5*</b>	PC5.5/PE- Cy5.5	495, 564	696
<b>PE-cyanine 7*</b>	PC7/PE-Cy7	495, 564	767
<b>Peridinin- chlorophyll*</b>	PerCP	482	678
<b>PerCP-cyanine 5.5*</b>	PerCP-Cy5.5	482	678
<b>Allophycocyanin*</b>	APC	650	660
<b>APC-cyanine 7</b>	APC-Cy7	650	785

\*Paling sering digunakan

Dalam alat flowsitometer, sinyal fluoresens dikumpulkan oleh detektor. Untuk mengoptimalkan sinyal, filter optik yang spesifik untuk rentang panjang gelombang tertentu ditempatkan di depan detektor, sehingga hanya sinar dengan rentang panjang gelombang yang sempit yang dapat mencapai detektor. Terdapat

beberapa jenis filter: *bandpass* (BP) yang mentransmisikan cahaya dalam rentang panjang gelombang spesifik, *shortpass* (SP) yang mentransmisikan cahaya dengan panjang gelombang kurang dari atau sama dengan panjang gelombang yang ditentukan, serta *longpass* (LP) yang mentransmisikan cahaya dengan panjang gelombang lebih dari atau sama dengan panjang gelombang yang ditentukan (Gb 3.7) (Leach et al., 2013).



**Gambar 3.7.** Filter yang digunakan dalam flowsitometri. (a) *Bandpass* filter, (b) *Shortpass* filter. (c) *Longpass* filter. (Leach et al., 2013)

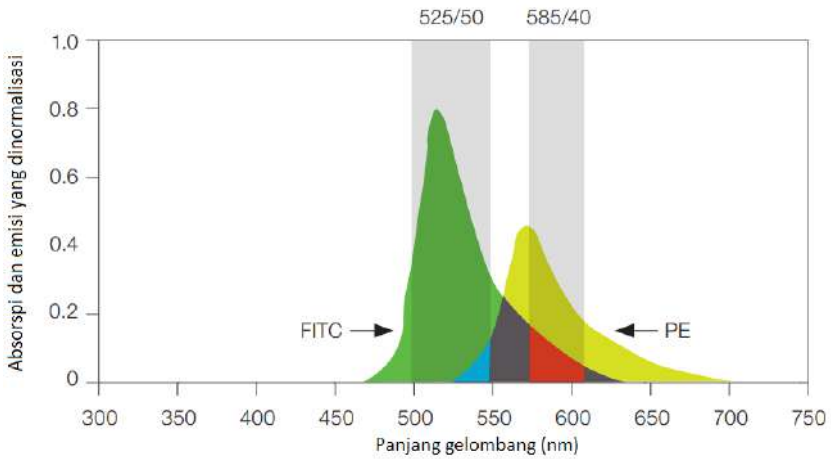
Intensitas fluoresensi atau *brightness* juga terekam oleh detektor, dan rerata intensitas fluoresensi untuk suatu populasi dinyatakan sebagai *mean fluorescence intensity* (MFI) yang menggambarkan kekuatan ekspresi atau integritas suatu antigen dalam populasi sel spesifik. Intensitas fluoresensi dapat digunakan untuk membedakan dua populasi dan membantu dalam penentuan *gating* (Leach et al., 2013).



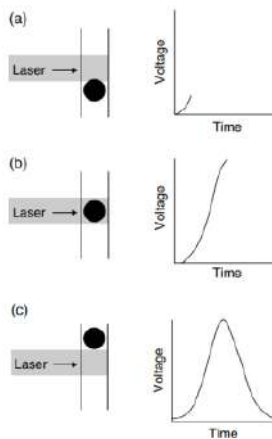
Konsep lain yang perlu diperhatikan pada deteksi fluoresensi ini adalah *spectral overlap*. Spektrum emisi untuk suatu fluorokrom dapat mencakup rentang panjang gelombang yang cukup besar, sehingga fluoresensi dari fluorokrom tersebut dapat terdeteksi oleh detektor yang dirancang untuk fluorokrom lain (*spillover*) (Gambar 3.8). Ini dikenal sebagai *spectral overlap*. *Spectral overlap* ini dapat menyebabkan kesalahan dalam analisis data, sehingga harus dilakukan koreksi terhadap sinyal yang timbul akibat *spillover* dengan cara mengurangi nilai *spillover* ini. Koreksi ini dikenal sebagai kompensasi. Kompensasi dapat dikerjakan secara manual, tetapi pada era di mana flowsitometer umumnya dapat mendeteksi lebih dari 6 warna, maka telah dikembangkan perangkat lunak yang dapat melakukan kompensasi secara otomatis (“Flowcytometry Basics Guide Practical Advice to Get You Started in Flow Cytometry,” 2020; Leach et al., 2013).

### **3.2.3. Sistem elektronik**

Sistem elektronik memungkinkan sinyal cahaya dikonversikan menjadi data numerik untuk analisis. Pada saat cahaya jatuh ke fotodetektor, foton dikonversi menjadi elektron yang menyebabkan timbulnya arus listrik. Arus listrik ini melewati penguat (*amplifier*) dan menimbulkan pulsasi tegangan (*voltage pulse*) yang proporsional dengan jumlah foton yang dideteksi. Pulsasi tegangan ini tercipta pada saat sel atau partikel memasuki sinar laser dan puncaknya tercapai pada saat sel atau partikel di posisi tengah pancaran sinar laser (Gambar 3.9) (Leach et al., 2013).



**Gambar 3.8.** *Spectral overlap* dan kompensasi fluoresensi. ■ spektrum emisi FITC; ■ spektrum emisi PE; ■ *band pass* filter; ■ bagian dari emisi FITC yang terdeteksi pada *channel* 585/40; ■ bagian dari emisi PE yang terdeteksi pada *channel* 525/50; ■ profil spektrum emisi FITC and PE yang tumpang tindih yang tidak terdeteksi oleh *channel* 525/50 atau 585/40. FITC, fluorescein isothiocyanate; PE, phycoerythrin (“Flowcytometry Basics Guide Practical Advice to Get You Started in Flow Cytometry,” 2020)



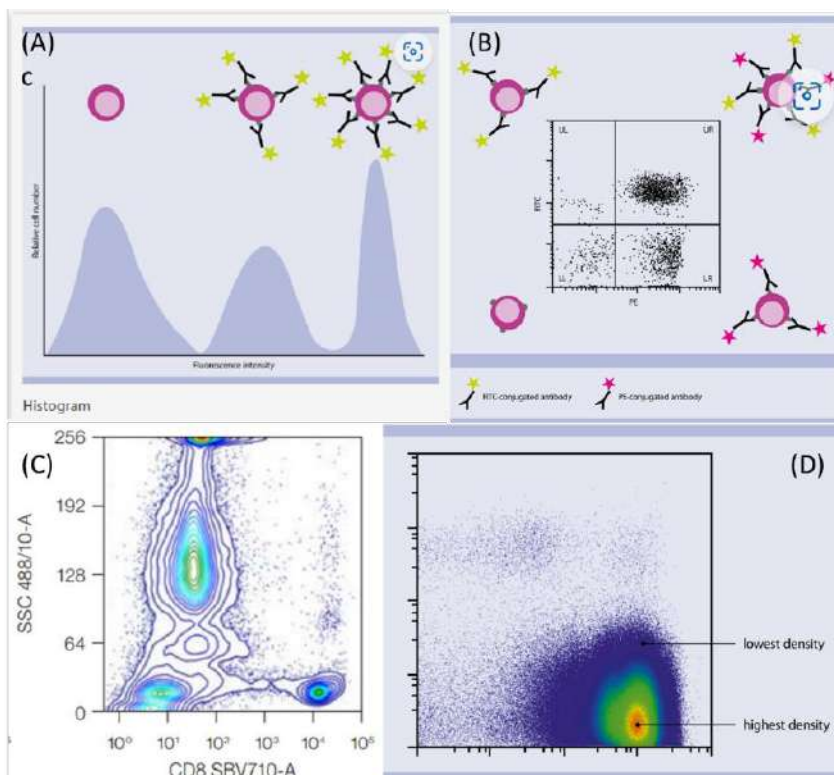
**Gambar 3.9.** Pulsasi tegangan yang timbul pada deteksi sinyal cahaya (Leach et al., 2013)

Agar sinyal dapat ditampilkan oleh komputer untuk dianalisis, sinyal harus diubah menjadi bentuk digital. Tinggi, lebar, dan luas area pulsasi tegangan dinyatakan dalam angka numerik dan diberi nomor *channel* oleh *analogue-to-digital convertor* (ADC). Nomor *channel* ini kemudian dipindahkan ke komputer dan ditampilkan sebagai titik pada grafik analisis. Sinyal ini bisa ditampilkan pada skala linear maupun logaritmik untuk analisis. Untuk mencegah interferensi akibat *noise* atau *debris*, dapat ditetapkan suatu ambang (*threshold*), di mana hanya sinyal di atas ambang yang akan diproses. Sinyal yang mempunyai nomor *channel* kemudian diproses dan disimpan dalam format standar yang dikenal sebagai “*listmode files*”. *File* data ini kemudian dapat ditampilkan dalam berbagai cara tergantung aplikasi perangkat lunak yang digunakan dan dianalisis sesuai kebutuhan (Leach et al., 2013).

### 3.3. Analisis data

Untuk analisis, data dapat ditampilkan dalam bentuk histogram, *dot plot*, *contour plot*, atau *density plot* (Gambar 3.10). Analisis data flowsitometri dibuat berdasarkan *gating* pada grafik. *Gating* dan area ditempatkan pada populasi sel yang diinginkan berdasarkan karakteristik umum seperti FSC, SSC, dan ekspresi penanda. *Gating* suatu populasi sel diperlukan untuk melakukan investigasi lebih lanjut dan kuantifikasi populasi yang diinginkan.

Perlakuan terhadap sel dapat menyebabkan perubahan terhadap sel. Contohnya pada proses pewarnaan intrasel, proses fiksasi dan permeabilisasi dapat menyebabkan perubahan ukuran dan granularitas, hal tersebut akan berpengaruh pada FSC dan SSC sel. Morfologi sel, dan karakteristik populasi yang ingin diketahui lebih lanjut harus selalu menjadi bahan pertimbangan dalam melakukan *gating*, untuk menghindari kesalahan interpretasi.



**Gambar 3.10.** (a) histogram (b) *dot plot* (c) *contour plot* (d) *density plot* (“Flow cytometry basics,” n.d.; “Flowcytometry Basics Guide Practical Advice to Get You Started in Flow Cytometry,” 2020.)

Perlakuan terhadap sel dapat menyebabkan perubahan terhadap sel. Contohnya pada proses pewarnaan intrasel, proses fiksasi dan permeabilisasi dapat menyebabkan perubahan ukuran dan granularitas. Hal tersebut akan berpengaruh pada FSC dan SSC sel. Morfologi sel dan karakteristik populasi yang ingin diketahui lebih lanjut harus selalu menjadi bahan pertimbangan dalam melakukan *gating* untuk menghindari kesalahan interpretasi.

### 3.3.1. *Forward scatter* dan *side scatter*

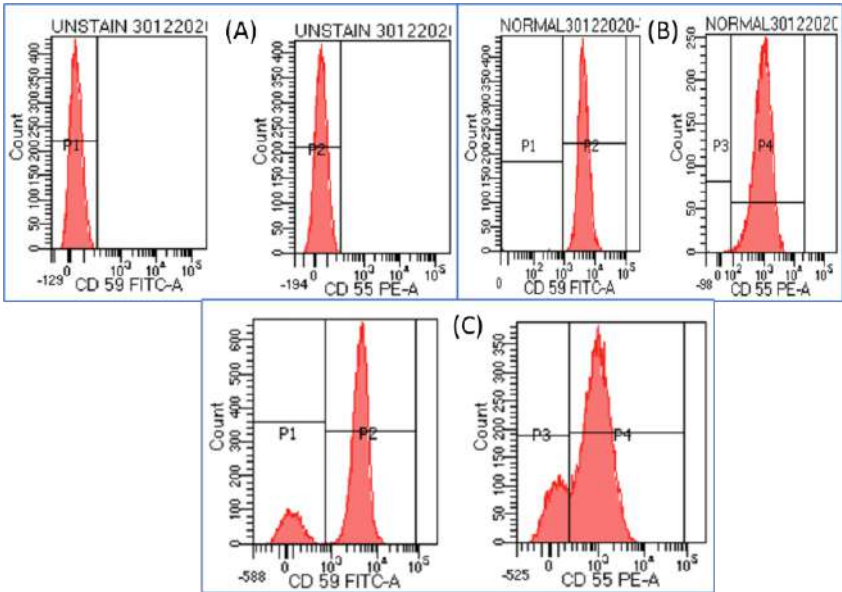
*Forward scatter* & SSC adalah langkah *gating* pertama yang umum digunakan. Menggunakan FSC dan SSC dapat membedakan populasi sel berdasarkan karakteristik ukuran dan kompleksitas sel. Pola *light scatter* dapat membedakan antara populasi granulosit, monosit, dan limfosit dengan populasi *debris* sel dan sel mati. *Debris* dan sel mati memiliki FSC rendah dan ditemukan pada bagian bawah pojok kiri dari diagram. Untuk menghindari *debris* maka ambang batas (*threshold*) FSC dapat ditinggikan, atau dapat menggunakan *gating* untuk memilih populasi yang akan diikutkan dalam analisis.

Selain menggunakan *density plot*, tampilan grafik juga dapat menggunakan *dot plot* atau *contour plot*, tergantung preferensi pengguna. *Dot plot* tidak memberikan informasi densitas populasi, sedangkan *contour map* dapat menunjukkan intensitas relatif pola *scatter*.

### 3.3.2. Satu parameter menggunakan histogram

*Single parameter histogram* dapat digunakan untuk melakukan investigasi lebih lanjut terhadap satu populasi. *Gating* dapat digunakan untuk memilih suatu populasi ataupun eksklusi suatu populasi pada investigasi lanjutan. Umumnya didapatkan satu puncak pada populasi di histogram, tetapi dapat pula ditemukan puncak multipel apabila populasi heterogen.

Kontrol negatif terhadap suatu populasi dapat menggunakan populasi tidak diwarnai (*unstained population*), *isotype*, ataupun FMO (*fluorochrome minus one*).



**Gambar 3.11.** *Single parameter histogram.* Kontrol negatif dapat menggunakan *unstained* (a) atau sampel normal (b). Grafik (c) menunjukkan populasi eritrosit dengan ekspresi CD59 dan CD55 negatif yang ditemukan pada penderita PNH (*Courtesy* RS Kanker Dharmais, 2022)

### 3.3.3. Dua parameter menggunakan *density plot/dot plot*

Grafik ini menampilkan dua parameter dalam satu grafik, Parameter ditampilkan pada aksis X dan Y. Parameter yang dapat ditampilkan pada aksis antara lain FSC, SSC, dan fluorokrom yang digunakan, tergantung pada hal yang ingin diketahui atau dianalisis.

### 3.3.4. *Back gating* untuk konfirmasi populasi

*Back gating* adalah metode yang digunakan untuk mengidentifikasi sel yang kerap dilakukan untuk mengkonfirmasi suatu populasi ataupun metode *gating*. Strategi ini digunakan ketika tidak yakin pada posisi *gating*, *expression level*, *nonspecific*

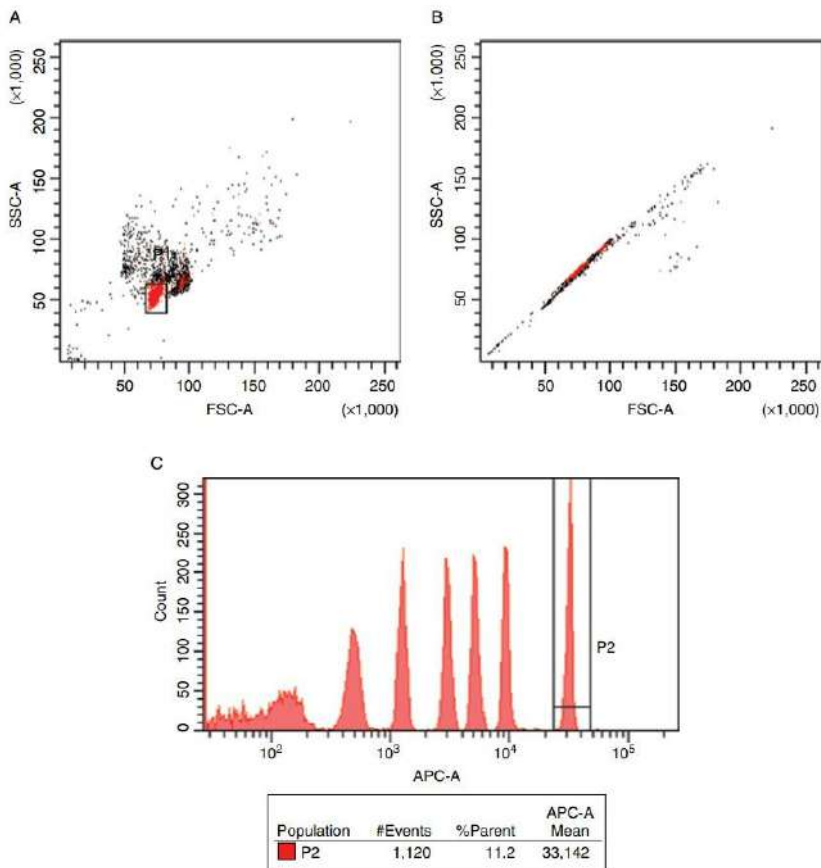
*binding*, dan memerlukan informasi tambahan untuk mengidentifikasi suatu populasi sel.

### 3.4. Pemantapan mutu

Untuk memastikan akurasi dan presisi data yang dihasilkan, maka perlu dilakukan pemantapan mutu, baik internal maupun eksternal. Pemantapan mutu internal dapat dilakukan menggunakan standar dan bahan kontrol komersial. “Standar” adalah suspensi *microbead*/partikel yang digunakan untuk *set up* atau kalibrasi instrumen, biasanya tidak perlu dilakukan preparasi. Bahan kontrol umumnya adalah analit, contohnya sel darah (*whole blood*) yang difiksasi, yang mempunyai rentang nilai yang telah ditentukan sebelumnya serta memerlukan preparasi dengan cara yang sama dengan sampel pasien.

Pemantapan mutu internal sebaiknya dilakukan setiap hari. Verifikasi kinerja instrumen dilakukan dengan memeriksa standar. Hasil pembacaan standar ini dinilai dengan melihat posisi *bead* pada *channel* target yang spesifik. (Gambar 3.12). Data hasil verifikasi harian ini dicatat, diplot ke dalam grafik Levey-Jennings dan dievaluasi berkala.

Pemantapan mutu baik internal dan eksternal juga harus dilakukan pada reagen dan prosedur pengerjaan. Ini dapat dilaksanakan menggunakan materi biologik berupa *whole blood* yang telah difiksasi dan tersedia secara komersial. UK NEQAS merupakan salah satu institusi yang menyelenggarakan program pemantapan mutu eksternal untuk pemeriksaan imunofenotiping.



**Gambar 3.12.** Contoh pemantauan mutu internal menggunakan *eight peak rainbow beads* untuk menilai stabilitas instrumen: grafik A menunjukkan *gating* pada P1 pada *bead singlet* untuk eksklusi *doublet*, grafik B menunjukkan bahwa FSC-Height versus FSC-Area proporsional, grafik C menunjukkan *gating* pada peak yang paling terang dan MFI-nya (Leach et al., 2013)

Selain melaksanakan pemantauan kinerja instrumen, laboratorium flowsitometri juga perlu memastikan kehandalan petugas pelaksana. Ini dapat dilaksanakan dengan membuat program pelatihan yang baik dan melaksanakan penilaian



kompetensi petugas secara berkala. Di samping itu, *standard operating procedure* harus selalu dievaluasi secara reguler dan diperbaharui sesuai dengan kondisi atau perubahan yang terjadi.

## **Daftar Pustaka**

Flow cytometry basics, 2020. Miltenyi Biotec. Diunduh dari: <https://www.miltenyibiotec.com/US-en/resources/macshandbook/macstechnologies/flow-cytometry/flow-cytometry-basics.html> (diakses: 22 November 2022)

Flowcytometry Basics Guide Practical Advice to Get You Started in Flow Cytometry, 2020. Bio-Rad Lab. Inc.

Leach, M., Drummond, M., Doig Allyson, 2013. Practical Flow Cytometry in Haematology Diagnosis, 1st ed. Willey Blackwell, England.

McKinnon, K.M., 2018. Flow Cytometry: An Overview. Curr. Protoc. Immunol. 120. Diunduh dari: <https://doi.org/10.1002/cpim.40>

Multicolor Flow Cytometry, 2020 . BD Biosci. URL <https://wwwbdbiosciences.com/en-us/learn/applications/multicolor-flow-cytometry#Overview>

► BD MAX™ MDR-TB

Bagaimana anda mencapai



# EFISIENSI?

*“Kebutuhan implementasi diagnostik cepat untuk panel obat yang lebih luas daripada yang tersedia saat ini karena adanya kemungkinan konsekuensi negatif dari skrining resistensi terhadap satu obat (RIF) dan penggunaan regimen standar MDR TB”<sup>1</sup>*

Asisten Profesor Kedokteran,  
Fakultas Kedokteran Universitas Boston

## Perluas Potensi Pengujian TB Lab Anda

### ► Assay BD MAX™ MDR-TB:

- Satu Assay dengan tiga hasil – MTB, RIF, INH.
- Solusi terintegrasi dari satu spesimen dan satu tes.
- Memungkinkan perawatan tepat waktu pada pasien yang tepat dan mencegah perularan.

Kunjungi [BDMAXDIFFERENCE.COM](http://BDMAXDIFFERENCE.COM)  
untuk mengetahui caranya



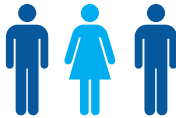
BD MAX™  
Sistem Molekuler Otomatis  
*Identifikasi cepat untuk  
RIF dan INH*



BD BACTEC™ MGIT™  
Sistem Kultur Cair  
Otomatis Mikobakterial  
*Pemeriksaan baku emas untuk  
MTB ID dan IST*



# Warisan kepercayaan dan kepemimpinan dalam mendukung perjuangan mendunia untuk mengeliminasi TB



TB membunuh 3 orang setiap menitnya<sup>2</sup>

ELI merekomendasikan pemeriksaan molekuler dan identifikasi dini MDR sebagai standar diagnostik untuk TB



Hanya 59%

Pasien MDR-TB berhasil diobati<sup>3</sup>



Skринing awal yang cepat terhadap INH dan RIF membantu mengarahkan pasien pada jalur klinis yang tepat. Hal ini membantu menghindari terapi yang mahal dan yang tidak perlu.

Nomor Katalog:  
BD MAX STR reagen: 443806  
BD MAX MDR TB Assay: 443878

#### Referensi:

1. Jacobson KR, Barnard M, Kleinman MB, Streicher EM, Ragan EJ, White LF, Shapiro O, Dolby T, Simpson J, Scott L, Stevens W, van Helden PD, Van Rie A, Warren RM. 2017. Implications of failure to routinely diagnose resistance to second-line drugs in patients with rifampicin-resistant tuberculosis on Xpert MTB/RIF: a multisite observational study. *Clin Infect Dis* 64:1502–1508. <https://doi.org/10.1093/cid/cix128>.
2. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/tuberculosis>
3. World Health Organization. Global tuberculosis report 2021. Available from: <https://www.who.int/publications/digital/global-tuberculosis-report-2021>
4. IFU - BD MAX MDR TB 443878

**BD Layanan Teknis Global : 1.800.631.0174**

**BD Layanan Pelanggan : 1.888.237.2762**

**BD Life Sciences - Integrated Diagnostic Solutions**

PT Becton Dickinson Indonesia

Sampoerna Strategic Square, South Tower 24th Floor,

Jl. Jendral Sudirman Kav. 45-46,

Jakarta, Indonesia 12930

t: +62215771920

**bd.com**

© 2022 BD. All rights reserved. BD, the BD logo, BD MAX and BACTEC MGIT are trademarks of Becton, Dickinson and Company or its affiliates. BD-58278 dicetak di Indonesia

## Assay BD MAX™ MDR-TB

**Satu Assay, Tiga hasil: MTB, RIF, INH**

- Melakukan deteksi TB MDR dengan sensitivitas tinggi<sup>4</sup>.
- Melakukan deteksi TB pada sampel dengan hasil apusan negatif.
- Memeriksa sampel segar maupun sampel dekontaminasi.
- Meningkatkan efisiensi alur kerja untuk manajemen pasien secara cepat.

### Sistem BD MAX:

Sistem BD MAX merupakan *platform* tunggal yang mampu menjalankan assay BD dan *assay* yang dikembangkan manufaktur, termasuk *Laboratory-Develop Tests (LDT)*.

- Memungkinkan Anda untuk menjalankan assay BD MAX MDR-TB di lingkungan lab manapun di dalam maupun di luar BSL-3.

**BD adalah mitra terpercaya dalam diagnostik TB di seluruh dunia. BD menawarkan solusi komprehensif untuk identifikasi, uji kepekaan obat dan informatika.**



# BAB IV

## LEUKEMIA PHENOTYPING

### 4.1. Panduan rujukan leukemia akut

Leukemia adalah suatu kelompok keganasan primer pada sumsum tulang, dan/atau jaringan ekstra-meduler. Leukemia akut terjadi karena mutasi pada sel progenitor hematopoetik, yang menyebabkan proliferasi tidak terkontrol dari sel neoplastik (blas) yang mengalami kehilangan kemampuan diferensiasi dan maturasi (Del Principe MI, 2019). Karakterisasi sel leukemik dapat dilakukan dengan berbagai modalitas yang terdiri dari sito/histomorfologi, sitokimia, dan sitogenetik molekuler. Imunofenotiping dengan flowsitometri dapat meningkatkan sensitivitas dan spesifisitas deteksi untuk menententukan karakteristik dari leukemia dan keganasan hematologi lain (van Dongen JJM, 2012).

Berdasarkan *guideline* WHO, diagnosis leukemia akut ditegakkan bila ditemukan persentase sel blas minimal 20% dari hitung total sel berinti atau sel non-eritroid, baik pada gambaran sumsum tulang atau darah tepi. Namun demikian, adakalanya sel leukemik dengan karakteristik abnormal sudah dapat terdeteksi walaupun belum mencapai 20%. Selain itu, leukemia akut dengan fenotipe campuran (*mixed phenotype acute leukemia*) tidak dapat diidentifikasi hanya berdasarkan morfologi sel darah tepi/sumsum tulang.

*Multiparameter flow cytometry* merupakan metode pemeriksaan menggunakan kombinasi antibodi monoklonal, sehingga secara simultan dapat mendeteksi ekspresi antigen permukaan dan/atau intraselular. Dalam hal deteksi leukemia akut, hal ini sangat membantu untuk mengidentifikasi dan membedakan sel leukemik

dari sel normal, dan mengidentifikasi lini hematopoietik yang terlibat yaitu limfoid B, T, mieloid, atau campuran. Oleh karena itu, hal penting dalam leukemia imunofenotiping adalah pemahaman yang baik dalam pemilihan panel antibodi monoklonal dan analisis serta interpretasi hasil pemeriksaan.

Oleh karena keterbatasan fasilitas dan tenaga ahli dalam flowsitometri, maka perlu dibuat panduan dan sistem rujukan, untuk memperluas jangkauan layanan pemeriksaan imunofenotiping pada leukemia akut. Prinsip yang harus diperhatikan adalah sampel pemeriksaan flowsitometri harus segar dan dalam kondisi semirip mungkin dengan kondisi *in vivo*. Idealnya, sampel harus sudah dipreparasi dalam kurun 4 jam sejak pengambilan sampel. Namun, jika sampel harus dirujuk ke fasilitas kesehatan lain, maka jangka waktu ini sulit dipenuhi. Dalam hal demikian, sampel darah/sumsum tulang dengan antikoagulan EDTA atau heparin, dapat disimpan dan dikirim pada suhu 4-8°C, selama 24 jam sampai waktu preparasi. Sampel tidak boleh dibekukan, karena akan merusak integritas sel (Leach M, 2011).

Pemeriksaan flowsitometri kadang-kadang memerlukan sediaan hapus dari sampel pemeriksaannya, baik darah tepi maupun sumsum tulang. Oleh karena perubahan morfologi sel darah untuk sediaan hapus terjadi lebih cepat, maka sediaan hapus harus segera dibuat setelah pengambilan sampel. Jika sampel akan dirujuk, maka fasilitas kesehatan/laboratorium perujuk harus membuat dan menyertakan sediaan hapus yang sudah difiksasi/diwarnai dengan Wright bersama dengan sampel pemeriksaan untuk pemeriksaan imunofenotiping.

## 4.2. Panel dasar imunofenotiping leukemia akut

*Multiparameter flow cytometry*, atau disebut juga *multicolor flow cytometry* adalah teknik pemeriksaan dengan prinsip flowsitometri yang menggunakan lebih dari dua antibodi monoklonal berlabel fluorokrom yang berbeda dalam satu tabung. Banyaknya fluorokrom yang bisa dicampurkan dalam satu tabung ditentukan oleh kemampuan alat flowsitometer yang digunakan berdasarkan ketersediaan filter dan fotodetektornya.

Pemilihan fluorokrom yang akan digunakan sangat tergantung pada kapasitas alat flowsitometer yang digunakan. Hal pertama yang harus diperhatikan adalah panjang gelombang eksitasi dari fluorokrom yang harus disesuaikan dengan panjang gelombang laser dari alat yang tersedia. Sebagai contoh: FITC akan tereksitasi oleh sinar laser dengan panjang gelombang 488 nm, sedangkan APC akan tereksitasi oleh panjang gelombang 652 nm, sehingga APC tidak dapat digunakan pada alat yang tidak memiliki laser merah dengan panjang gelombang 652 nm. Hal kedua yang harus diperhatikan adalah panjang gelombang emisi dari masing-masing fluorokrom, apakah panjang gelombang cahaya emisi masuk dalam rentang deteksi dari fotodetektor alat.

Panel dasar adalah panel yang dapat digunakan untuk membantu mendiagnosis leukemia akut pada kondisi minim sumber daya. Kombinasi antibodi monoklonal atau panel antibodi untuk diagnosis leukemia akut harus setidaknya mampu membedakan populasi sel leukemik (blas) dari populasi sel normal, dan mengidentifikasi lini hematopoietik yang terlibat yaitu limfoid B, T, M (mieloid), atau campuran (*mixed phenotype*). Penanda CD45 dan CD34 dapat digunakan sebagai *anchor marker* untuk deteksi leukemia akut ( Leach M, 2011).

Panel dasar bisa disusun meliputi penanda penentu lini hematopoietik (*lineage determination marker*) saja. Tetapi harus disadari, panel dasar yang hanya terdiri dari *lineage determination marker* saja tidak dapat digunakan untuk pemantauan atau penentuan *minimal residual disease* (MRD). *Lineage determination marker* yang dapat dipakai adalah CD3 untuk limfoid T, CD19 untuk limfoid B, MPO untuk mieloid, serta *non-lineage marker* CD45 dan CD34. Berdasarkan kriteria WHO 2008, untuk limfoid B tidak cukup CD19 sebagai *single marker* untuk lini limfoid B, oleh karena itu dapat ditambahkan paling tidak salah satu dari marker sitoplasmik CD79a, CD10, dan CD22. Demikian pula untuk lini mieloid, selain MPO perlu ditambahkan paling tidak 2 penanda untuk lini monositik seperti CD11c, CD14, CD64, atau NSE (Arber DA, 2016).

Pada alat flowsitometri dengan kemampuan 3-color atau 4-color, semua penanda dasar tersebut tentu saja tidak mungkin dicampurkan dalam satu tabung. Oleh karena itu, dibuat *multi-tube panel* (panel multi tabung), dan di masing-masing tabung ditambahkan *anchoring marker* untuk memastikan kesinambungan antar tabung, contohnya CD45 dan/atau CD34. Berikut adalah contoh panel dasar untuk flowsitometri 4-color di Tabel 4.1.

**Tabel 4.1. Panel dasar empat warna**

Fluorokrom				Penanda
FITC	PE	PerCp	APC	
CD3	CD19	CD45	CD34	Lini B vs T
HLA-DR	CD14	CD45	CD34	Lini Monositik
CD7	CD3	CD45	CD34	Lini T
CD10	CD13,33	CD45	CD34	Lini B vs M
MPO	cyCD3	CD45	CD34	Intraseluler M vs T
CD20	cyCD79a	CD45	CD34	Intraseluler B

Keterangan: c = *cytoplasmic*.

### 4.3. Panel penyaring dan panel konfirmasi

Pada laboratorium yang memiliki kapasitas dan sumber daya yang memadai, flowsitometri dapat dikembangkan untuk panel *extended* yang dapat dimanfaatkan untuk kepentingan diagnostik, pemantauan, dan deteksi *minimal residual disease* dan relaps. Pada kecurigaan leukemia berdasarkan pemeriksaan morfologi darah tepi dan/atau sumsum tulang, pemeriksaan flowsitometri awal diperlukan untuk menyaring dan membedakan kondisi leukemia akut, leukemia kronik, reaksi leukemoid, atau *recovering marrow*. Untuk itu perlu dirancang panel penyaring untuk membedakan suatu kondisi keganasan dan non keganasan. Panel penyaring dapat menggunakan panel dasar seperti pada Tabel 4.1.

Jika memiliki fasilitas flowsitometri dengan minimal 6-warna dapat juga memakai panel yang tersedia secara komersial seperti *acute leukemia orientation tube* (ALOT), yang terdiri dari (van Dongen JJM, 2012):

1. Penanda pan-leukosit (CD45)
2. Penanda imaturitas (CD34)
3. Penanda lini T (CD7, CD3 sitoplasmik dan permukaan)
4. Penanda lini M (MPO sitoplasmik)
5. Penanda lini B (CD79a sitoplasmik dan CD19).

**Tabel 4.2.** Panel ALOT

Pacific Blue	Pacific Orange	FITC	PE	PerCP-Cy5.5	PE-Cy7	APC	APC-H7
cyCD3	CD45	cyMPO	cyCD79a	CD34	CD19	CD7	CD3

Panel penyaring lain juga dapat dirancang berdasarkan temuan awal, minimal salah satu dari kondisi klinis atau laboratoris sebagai berikut (van Dongen JJM, 2012):

1. *Lymphocytosis screening tube* (LST): limfositosis, pembesaran kelenjar getah bening, splenomegali, limfosit atipik,



ditemukannya komponen monoklonal pada serum, dan gejala neurologis atau sitopenia yang tidak diketahui penyebabnya. Panel ini mendeteksi populasi limfosit matur abnormal pada lini B, T, dan NK (*natural killer*).

**Tabel 4.3.** Panel LST

Pacific Blue	Pacific Orange	FITC	PE	PerCP-Cy5.5	PE-Cy7	APC	APC-H7
CD20 dan CD4	CD45	CD8 dan Ig $\lambda$	CD56 dan Ig $\alpha$	CD5	CD19 dan TCR- $\gamma\delta$	CD3	CD38

2. *Plasma cell screening tube* (PCST): ditemukannya komponen monoklonal non-IgM, lesi tulang, dan plasmositosis pada sumsum tulang. Panel ini bertujuan mengidentifikasi dan membedakan antara sel plasma normal (misalnya pada plasmositosis reaktif) dengan sel plasma abnormal (misalnya mieloma multipel).

**Tabel 4.4.** Panel PCST

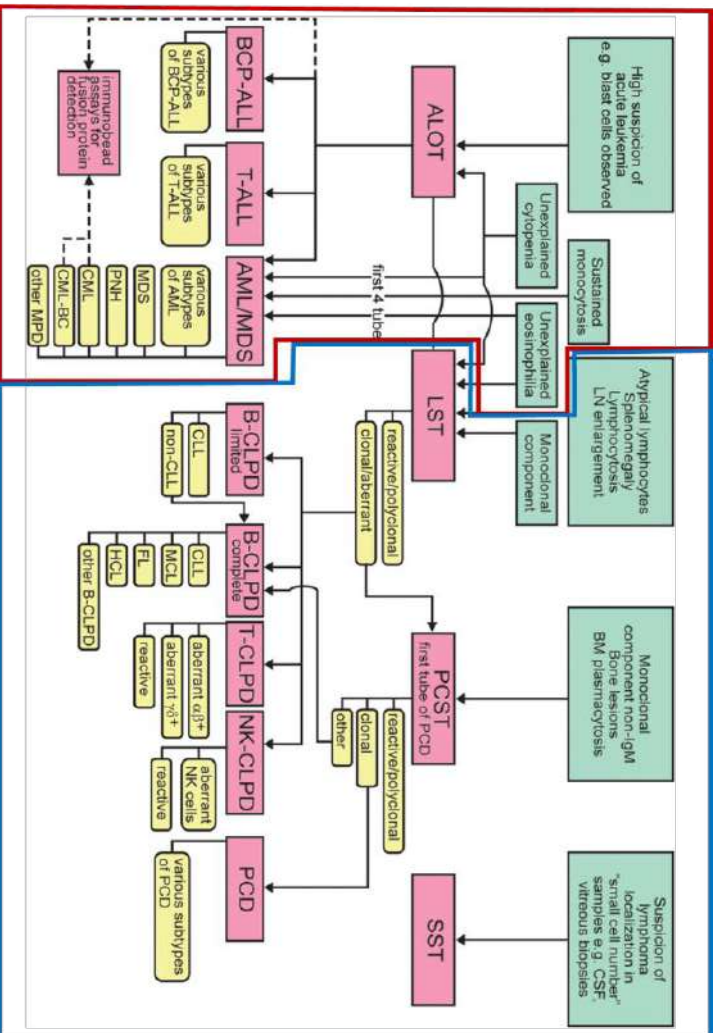
Tabung	Pacific Blue	Pacific Orange	FITC	PE	PerCP - Cy5.5	PE-Cy7	APC	APC - H7s
1	CD45	CD138	CD38	CD56	$\beta$ 2-micro	CD19	cyIg $\alpha$	Ig $\lambda$
2	CD45	CD138	CD38	CD28	CD27	CD19	CD117	CD81

3. *Small sample tube* (SST): kecurigaan adanya sel hematologi ganas pada sampel dengan hitung sel yang sangat rendah, seperti spesimen aspirasi jarum halus, cairan otak, cairan vitreus, dan lainnya. Panel ini dapat membedakan sel limfosit normal dari sel limfosit abnormal.

**Tabel 4.5.** Panel SST

<b>Pacific Blue</b>	<b>Pacific Orange</b>	<b>FITC</b>	<b>PE</b>	<b>PerCP-Cy5.5</b>	<b>PE-Cy7</b>	<b>APC</b>	<b>APC-H7</b>
CD20	CD45	CD8 dan Ig $\lambda$	CD56 dan Ig $\alpha$	CD4	CD19	CD3 dan CD14	CD38

Panel lanjutan dapat dirancang untuk konfirmasi lini hematopoietik yang terlibat dan tingkat maturasinya, deteksi fenotipe campuran, atau deteksi *leukemia associated antigen (LAA)* sebagai dasar (*baseline*) deteksi MRD, atau untuk identifikasi target terapi. Selain itu pada panel *extended* juga dapat ditambahkan penanda untuk deteksi lini eritroid, dan megakariositik. Berbagai panel lanjutan dapat mengadaptasi dari pedoman EuroFlow, mengikuti *flowchart* sebagai mana tercantum di Gambar 4.1 berikut (van Dongen JJM, 2012).



**Gambar 4.1.** Alur strategi EuroFlow: Penentuan karakteristik fenotipik pada keganasan hematologi (van Dongen JJM, 2012). Area pada garis merah meliputi leukemia akut, sedangkan area pada garis biru meliputi leukemia atau keganasan hematologi kronik.

Keterangan singkatan: ALOT, *acute leukemia orientation tube*; AML, *acute myeloid leukemia*; BC, *blast crisis*; BCP, *B-cell precursor*; BM, *bone marrow*; CLL, *chronic lymphocytic leukemia*; CLPD, *chronic lymphoproliferative disorders*; CML, *chronic myeloid leukemia*; CSF, *cerebrospinal fluid*; FL, *follicular lymphoma*; HCL, *hairy cell leukemia*; LN, *lymph node*; LST, *lymphoid screening tube*; MCL, *mantle cell lymphoma*; MDS, *myelodysplastic syndrome*; MPD, *myeloproliferative disorders*; PCD, *plasma cell disorders*; PCST, *plasma cell screening tube*; PNH, *paroxysmal nocturnal hemoglobinuria*; SST, *small sample tube*.

#### 4.4. *Extended panel leukemia phenotyping*

Beberapa indikasi panel *extended* adalah sebagai berikut (Wood B, 2006):

1. Sebagai panel konfirmasi untuk pemeriksaan sampel dengan *lineage* yang masih meragukan pada panel sebelumnya.
2. *Profiling* fenotipe lengkap (sifat dan aberansi molekuler) dari populasi sel abnormal, misalnya untuk pemantauan *baseline* (sebelum terapi) dan setelah terapi.
3. Sebagai panel lanjutan yang lebih spesifik dari panel sebelumnya (Gambar 4.1).

Pedoman EuroFlow mendesain alur panel lanjutan berdasarkan temuan pada panel sebelumnya, sebagai berikut:

1. *T-cell acute lymphocytic leukemia* (T-ALL): ditemukannya populasi sel abnormal yang dominan mengekspresikan CD3 dan/atau cyCD3 positif. Panel ini bertujuan untuk identifikasi, klasifikasi, penentuan *maturation arrest*, dan profil fenotipe dari ALL-T.

**Tabel 4.6.** Panel lanjutan untuk ALL-T

Tabung	Pacific Blue	Pacific Oran-ge	FITC	PE	PerCP - Cy5.5	PE-Cy7	APC	APC - H7
1	cyCD3	CD45	nu TdT	CD 99	CD5	CD10	CD1a	CD3
2	cyCD3	CD45	CD2	CD 117	CD4	CD8	CD7	CD3
3	cyCD3	CD45	TCR- $\gamma\delta$	TCR - $\alpha\beta$	CD33	CD56	cTCR $\beta$	CD3
4	cyCD3	CD45	CD 44	CD 13	HLA-DR	CD45 RA	CD 123	CD3

Keterangan: c = *cytoplasmic*, nu = *nuclear*.

2. *B-cell precursor ALL* (BCP-ALL): Ditemukannya populasi sel abnormal yang dominan mengekspresikan CD19 dan/atau cyCD79a positif. Panel ini bertujuan untuk identifikasi, klasifikasi, penentuan *maturation arrest*, dan profil fenotipe dari ALL-B.

**Tabel 4.7.** Panel lanjutan untuk BCP-ALL

Tabung	Pacific Blue	Pacific Oran-ge	FITC	PE	PerCP - Cy5.5	PE - Cy 7	APC	APC - H7
1	CD 20	CD45	CD58	CD66c	CD34	CD 19	CD 10	CD 38
2	IgK	CD45	cIgu	CD33	CD34	CD 19	Igu, CD 117	IgL
3	CD9	CD45	nuTdT	CD13	CD34	CD 19	CD 22	CD 24
4	CD 21	CD45	CD15, CDw65	NG2	CD34	CD 19	CD 123	CD 81

Keterangan: c = *cytoplasmic*, nu = *nuclear*.

3. *Acute myelocytic leukemia-myelodysplastic syndrome* (AML-MDS).  
Panel ini dapat dikerjakan sebagai panel lanjutan apabila

sebelumnya ditemukan sitopenia atau monositosis persisten yang tidak diketahui penyebabnya, populasi sel abnormal yang dominan mengekspresikan penanda lini neutrofilik (tabung 1), monositik (tabung 2), eritroid (tabung 3), ekspresi aberan pada penanda limfoid (tabung 4), lini megakariositik/basofilik/dendritik (tabung 5-6). Kombinasi tabung 1 dan 2 juga dapat membantu mendeteksi PNH (*paroxysmal nocturnal hemoglobinuria*). Tabung 7 hanya digunakan untuk subklasifikasi keganasan megakariositik.

**Tabel 4.8.** Panel lanjutan untuk AML-MDS

Tabung	Pacific Blue	Pacific Orange	FITC	PE	PerCP - Cy5.5	PE - Cy7	APC	APC - H7
1	HLA-DR	CD45	CD16	CD13	CD34	CD117	CD11b	CD10
2	HLA-DR	CD45	CD35	CD64	CD34	CD117	IREM2	CD14
3	HLA-DR	CD45	CD36	CD105	CD34	CD117	CD33	CD71
4	HLA-DR	CD45	nuTdT	CD56	CD34	CD117	CD7	CD19
5	HLA-DR	CD45	CD15	NG2	CD34	CD117	CD22	CD38
6	HLA-DR	CD45	CD42a dan CD61	CD203c	CD34	CD117	CD123	CD4
7	HLA-DR	CD45	CD41	CD25	CD34	CD117	CD42b	CD9

Keterangan: c = *cytoplasmic*, nu = *nuclear*.

#### 4.5. Panel kapasitas ekstensif

Panel kapasitas ekstensif adalah panel yang memiliki kapasitas banyak warna (8-12 warna) dalam satu tabung, sehingga dapat memperoleh data sebanyak-banyaknya dari jumlah spesimen yang

minimal. Panel ini bermanfaat pada kondisi sebagai berikut (Wood B, 2006):

1. Membutuhkan informasi spesifik dari sampel yang sangat sedikit.
2. Membutuhkan TAT (*turnaround time*) yang lebih cepat.
3. Mengidentifikasi populasi abnormal yang esoterik/jarang ditemukan, atau dengan jumlah populasi sangat kecil. Contoh: Kecurigaan kuat MRD yang tidak terdeteksi pada panel sebelumnya.
4. Membutuhkan data spesifik yang dibutuhkan oleh laboratorium tertentu.

Panel dengan kapasitas ekstensif biasanya bersifat khusus dan dibuat sendiri oleh masing-masing laboratorium yang memeriksa. Kunci dalam mempersiapkan panel adalah sebagai berikut (Baumgarth N, 2000):

1. Ketahui sifat dan fungsi dari masing-masing *marker* yang akan digunakan, misalnya:
  - a. Penanda imaturitas: CD34.
  - b. Penanda pan-leukosit: CD45.
  - c. Penanda sel B: kappa, lambda, CD19, CD20, CD10, CD38.
  - d. Penanda sel T dan NK: CD2, CD3, CD4, CD5, CD7, CD8, CD56, CD16 .
  - e. Penanda sel pan-mieloid: CD13, CD33.
  - f. Penanda sel mieloid muda: CD117, HLA-DR, CD38.
  - g. Penanda sel granulosit matur: CD10, CD14, CD15, CD16, CD117, CD11b.
  - h. Penanda monosit/sel dendritik: HLA-DR, CD4, CD14, CD15, CD38, CD64, CD123, CD36, CD11b.
  - i. Penanda sel eritroid: CD38, CD71, CD117.

2. Ketahui prinsip desain panel flowsitometri. Beberapa hal utama yang harus diperhatikan dalam mendesain panel flowsitometri adalah sebagai berikut:
  - a. Pasangkan fluorokrom yang lebih redup (mis. FITC, Alexa700) dengan antigen yang diekspresikan secara kuat (mis. neutrofil CD16). Hal sebaliknya juga berlaku; pasang antigen yang diekspresikan secara lemah dengan fluorokrom yang lebih terang.
  - b. Tingkatkan informasi sebanyak-banyaknya yang bisa diperoleh dari setiap tabung. Pastikan setiap lini sel memiliki *lineage defining marker* dan penanda lainnya yang paling mungkin menjadi fenotipe aberan. Untuk penanda pelengkap, pilih yang bersifat multifungsi.
  - c. Kurangi *marker redundancy* (menggunakan banyak penanda dengan fungsi yang sama).

Salah satu contoh panel kapasitas ekstensif adalah panel yang direkomendasikan oleh *guideline* fenotiping keganasan hematologi yang dibuat oleh *French Groupe d'Etude Immunologique des Leucémies* (GEIL) menggunakan sistem flowsitometri 10 warna (Tabel 4.9).



**Tabel 4.9. Contoh Panel Kapasitas Ekstensif (10-warna) (Publication C, 2018)**

	<b>FTTC</b>	<b>PE</b>	<b>ECD</b>	<b>PE5.5</b>	<b>PC7</b>	<b>APC</b>	<b>A700</b>	<b>A750</b>	<b>Pacific Blue</b>	<b>Krom Orange</b>
<b>Penanda (tabung)</b>	<b>FTTC</b>	<b>PE</b>	<b>APCH 7</b>	<b>PerCP -Cy5.5</b>	<b>APC</b>	<b>APCR 700</b>	<b>PECy7</b>	<b>BV605</b>	<b>V450</b>	<b>V500c</b>
<b>Stitoplasma</b>	TdT/ MPO/ K	MPO/ CD10/ L	cyCD 13	CD33	CD34	cyCD 79a/ IgM	cyCD 22	cyCD3 CD11b	sCD3/ CD11b	CD45
<b>Leukemia Akut</b>	cMPO	cyCD 79a	CD3	CD7	CD34		CD19		cyCD3	CD45
<b>Limfoid Matur</b>	CD8	CD56	CD38	CD5	CD3	CD79b	CD19		CD20	CD45
	slamb da	sKappa					TCR $\gamma\delta$		CD4	
<b>LPD (penyaring)</b>	CD103	CD10	CD13	CD5	CD11c	CD123	CD25	CD19	CD20	CD45
<b>LPD T/NK (1)</b>	DR	CD10	CD4	CD5	CD8	CD2	CD7	CD25	CD3	CD45
<b>LPD T/NK (2)</b>	TCRG D	TCRA B		CD5	CD8	CD2	CD56	CD16	CD57	CD45
<b>B-CLPD (penyaring)</b>	CD23	CD10	CD43	CD79b	CD200		CD19		CD20	CD45
<b>CLL</b>	CD81	CD43		CD5	CD23	CD38	CD22	CD19	CD20	CD45

	FITC	PE	ECD	PE5.5	PC7	APC	A700	A750	Pacific Blue	Krom Orange
<b>Penanda (tabung)</b>	<b>FITC</b>	<b>PE</b>	<b>APCH 7</b>	<b>PerCP -Cy5.5</b>	<b>APC</b>	<b>APCR 700</b>	<b>PECy7</b>	<b>BV605</b>	<b>V450</b>	<b>V500c</b>
<b>CLL (washed)</b>	sKappa	sLamb da		CD5	CD23	CD79b	CD22	CD19	FMC7	CD45
<b>B-CLPD non CLL (1)</b>	CD31	LAIR1	CD81	CD11c	Ig $\alpha$	CD62L	CD19	CD39	CD20	CD45
<b>B-CLPD non CLL (2)</b>	CD103	CD95	CD49d	CD22	CXCR 5	HLA-DR	CD19	CD27	CD20	CD45
<b>LPD (washed)</b>	sKappa	sLamb da	CD4	CD5	CD8	CD3	CD56	CD19	CD20	CD45
<b>PCD (1)</b>	CD38	CD56	cIgA	$\beta$ 2micr o	sIgK		CD19		CD138	CD45
<b>PCD (2)</b>	CD38	CD28	CD81	CD27	CD117		CD19		CD138	CD45
<b>ALL-B (1)</b>	CD58	CD10			CD34	CD123		CD19	CD38	CD45
<b>ALL-B (2)</b>	CD81	CD10	CD13	CD33	CD34	CD15	CD22	CD19	CD20	CD45
<b>ALL-T (1)</b>	CD1a	CD10	CD4	CD5	CD8	CD2	CD7	c $\gamma$ CD3	CD3	CD45
<b>ALL-T (2)</b>	(TdT)	CD99	CD13	CD33	CD34	CD117		c $\gamma$ CD3	CD3	CD45
<b>AML-MDS (1)</b>	CD65/ 15	CD14	CD13	CD33	CD34	CD117	CD7	CD11b	CD16	CD45

	FITC	PE	ECD	PE5.5	PC7	APC	A700	A750	Pacific Blue	Krom Orange
Penanda (tabung)	FITC	PE	APCH 7	PerCP -Cy5.5	APC	APCR 700	PEGy7	BV605	V450	V500c
AML-MDS (2)	CD64	CD10	CD4	CD33	CD34	CD123	CD56	CD19	CD38	CD45
AML-MDS (3)	CD36	CD61	(CD24)	CD33	CD34	CD15	CD2	CD71	DR	CD45

BCLPD: *B-chronic lymphoproliferative disorders*, CLL: *Chronic lymphocytic leukemia*, ALL: *Acute lymphocytic leukemia*, AML: *Chronic myelocytic leukemia*, LPP: *Lymphoproliferative disorders*

## Daftar Pustaka

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 May 19;127(20):2391–405.

Baumgarth N, Roederer M. A practical approach to multicolor flow cytometry for immunophenotyping. *J Immunol Methods*. 2000 Sep 21;243(1–2):77–97.

Del Principe MI, De Bellis E, Gurnari C, Buzzati E, Savi A, Consalvo MAI, et al. Applications and efficiency of flow cytometry for leukemia diagnostics. *Expert Rev Mol Diagn*. 2019 Dec;19(12):1089–97.

Leach M, Doid A, Drummond M. Flow cytometry of hematological malignancies. Chichester, West Sussex, UK: Wiley-Blackwell; 2011. 311 p.

Publication C. Panel proposal for the immunophenotypic diagnosis of hematological malignancies. A collaborative consensus from the groupe d'Etude Immunologique des Leucémies (GEIL). *Cytometry B Clin Cytom*. 2018;94(3):542–7.

van Dongen JJM, Lhermitte L, Böttcher S, Almeida J, van der Velden VHJ, Flores-Montero J, et al. EuroFlow antibody panels for standardized n-dimensional flow cytometric immunophenotyping of normal, reactive and malignant leukocytes. *Leukemia*. 2012 Sep;26(9):1908–75.

Wood B. 9-color and 10-color flow cytometry in the clinical laboratory. *Arch Pathol Lab Med.* 2006 May;130(5):680–90.

# BAB V

## PENERAPAN IMUNOFENOTIPING LEUKEMIA DI INDONESIA

### 5.1. Sejarah

Fluorescence flow cytometry untuk pelayanan klinis di Indonesia dirintis oleh Prof. dr. Siti Boedina Kresno, SpPK(K) pada tahun 1993. Sebelumnya telah ada instrumen BD FACS-Scan di Indonesia di laboratorium NAMRU, tetapi hanya digunakan untuk penelitian. Atas prakarsa beliau, maka pada tahun 1994 instrumen flow cytometer FACS-Scan yang mempunyai konfigurasi 1 laser-3 *color* mulai digunakan untuk pelayanan pasien di RS Kanker Dharmas (RSKD). Aplikasi awal flow cytometry adalah untuk pemeriksaan subset limfosit.

Pada tahun 1995, pertama kali dilakukan pemeriksaan imunofenotiping untuk leukemia dengan *Leukemia Phenotyping Kit* dari BD yang berbasis 3-*color*. Pada tahun 2002, RSKD mendapatkan alat flow cytometer BD FACS Calibur yang mempunyai konfigurasi 1 laser-4 *color*. Dengan konfigurasi ini, imunofenotiping leukemia dengan strategi CD45 *gating* dapat diterapkan. CD45 *gating* ini memungkinkan visualisasi populasi sel blas yang terpisah dari populasi limfosit. Pada era ini, beberapa institusi pendidikan juga telah mengembangkan pemeriksaan flow cytometry, seperti Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia (FKUI)-Rumah Sakit Cipto Mangunkusumo (RSCM), Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada (FK UGM)- RS Sardjito serta Rumah Sakit dr. Soetomo. Pemeriksaan imunofenotiping juga tidak terbatas pada penanda permukaan saja, tetapi juga penanda intraseluler, seperti yang diterapkan oleh FKUGM-RS

Sardjito dan FKUI-RSCM. Contoh panel 4-*color* yang digunakan dapat dilihat pada Bab 4.

Terbitnya pedoman diagnosis dan klasifikasi keganasan hematolimfoid dari World Health Organization (WHO) tahun 2008 yang mensyaratkan pemeriksaan imunofenotiping sebagai salah satu kriteria dalam klasifikasi leukemia mendorong penerapan imunofenotiping leukemia di Indonesia. Dengan makin meningkatnya *awareness* pada klinisi, maka permintaan untuk pemeriksaan ini terus meningkat. Pada tahun 2012, dengan masuknya teknologi 2 laser-6 *color* (BD FACS Canto), mulai dikembangkan panel 6 *color*. RS dr. Kariadi merupakan salah satu RS yang mulai mengembangkan pemeriksaan imunofenotiping leukemia dengan panel 6 *color*. Pada saat itu, ketersediaan reagen masih menjadi kendala, di mana reagen yang telah diregistrasikan masih terbatas karena penggunaannya masih sedikit.

Pada tahun 2016, teknologi 3 laser-8 *color* (BD FACS Canto II) mulai diperkenalkan di Indonesia. Pemeriksaan imunofenotiping juga makin dikenal, dan dikembangkan di berbagai senter pendidikan dan instansi kesehatan di berbagai ibukota propinsi dan kota besar di Indonesia, seperti Medan, Palembang, Pekanbaru, Banjarmasin, Solo, dan Denpasar. Tahun 2022, diluncurkan program pengampunan untuk RS rujukan layanan kanker di Indonesia. Dengan program ini, maka RS regional ditingkatkan kapasitas dan kemampuannya untuk pelayanan kanker, salah satunya dengan pemeriksaan flowsitometri.

Perkembangan alat dan teknik flowsitometri, keberagaman metode analisis imunofenotiping, perkembangan antibodi penanda dan fluorokrom berpotensi memunculkan variabilitas hasil dan interpretasi serta berpotensi menyebabkan peningkatan biaya operasional pemeriksaan dikarenakan berbagai pilihan penanda dan fluorokrom yang tersedia. Variasi teknik antar

laboratorium penyelenggara pemeriksaan imunofenotiping disertai dengan keberagaman strategi dan panel antibodi yang digunakan mendorong kebutuhan suatu standarisasi panel pemeriksaan sehingga didapatkan hasil diagnostik flowsitometri dengan keberulangan baik. Standarisasi pemeriksaan ini pertama kali dilakukan pada tahun 2007. *Bethesda International Consensus* adalah konsensus pertama yang digunakan untuk mengevaluasi galur sel pada leukemia akut. Selanjutnya, tahun 2012 EuroFlow menerbitkan panel antibodi 8 warna untuk diagnosis dan klasifikasi leukemia akut. EuroFlow telah melakukan optimasi dan standarisasi protokol *immunostaining* untuk diagnosis, klasifikasi, dan subklasifikasi prognosis untuk keganasan hematologi, begitu pula untuk deteksi MRD selama pemantauan (Della Starza et al., 2019; Wang, 2014).

Di Indonesia, penerapan strategi ini menjadi lebih menantang terkait dengan modalitas dan pembiayaan jaminan nasional. Penggunaan panel yang baku diharapkan mendorong ke arah standarisasi hasil, disamping pada akhirnya akan mengurangi *unit cost*. Teknologi *dry-tube* juga mulai diperkenalkan di mana kombinasi fluorokrom dalam panel (*cocktail*) yang telah dibakukan disediakan dalam tabung khusus dengan format reagen yang kering, sehingga preparasi menjadi sangat mudah dan mengurangi risiko kesalahan karena harus melakukan pemipetan banyak fluorokrom ke dalam banyak tabung. Konsentrasi antibodi dalam tiap *cocktail* juga telah dioptimasi sehingga didapatkan rasio antigen-antibodi yang optimal tanpa harus melakukan titrasi antibodi.

## **5.2. Panel diagnosis leukemia akut**

Diagnosis leukemia akut menggunakan imunofenotiping dilakukan dengan penentuan populasi abnormal, penentuan galur



sel dan *leukemia associated immunophenotype* (LAIP). Oleh karena itu panel antibodi untuk leukemia akut dirancang untuk mengenali sel abnormal, dan galurnya yaitu limfosit prekursor sel B, prekursor sel T, dan mieloid (Tabel 5.1). Pemeriksaan ini harus menggunakan pewarnaan multipel (*multicolor staining*), minimal 4 warna. Kelompok AIEOP-BFM (*Associazione Italiana Ematologia Oncologia Pediatrica dan the Berlin-Frankfurt-Munster*) merekomendasi penggunaan 6 warna untuk pemeriksaan ALL. Pada tiap tabung digunakan CD45 sebagai penanda utama dan penanda lain untuk identifikasi galur (limfoid atau mieloid) untuk mendapatkan sel leukemia dan sel lain yang dapat digunakan sebagai kontrol. Penilaian imunofenotiping populasi sel leukemia sebaiknya dibandingkan dengan sel lain pada tabung yang sama. Perbandingan tersebut untuk menentukan batasan positif dengan negatif, *dim* atau terang/*bright*, populasi heterogen dan homogen (Dworzak et al., 2018; Hoelzer et al., 2016).

Kelompok EuroFlow telah mengembangkan panel antibodi 8 warna untuk diagnosis dan klasifikasi leukemia akut, yang telah distandarisasi dengan berbagai perangkat flowsitometri. Pemeriksaan menggunakan panel ini dilakukan dengan 2 tahap. Tahap pertama, panel *acute leukemia orientation tube* (ALOT), digunakan untuk mengenali tipe leukemia akut klasik (ALL sel T, ALL prekursor sel B, dan leukemia mieloid akut) serta leukemia akut lini ambigu (*acute leukaemia of ambiguous lineage*). Tahap kedua, berdasarkan hasil skrining pada tabung ALOT ditentukan panel selanjutnya yang sesuai. Tujuannya untuk mendapat karakteristik spesifik leukemia akut berdasarkan skrining panel ALOT. Panel antibodi EuroFlow dirancang sesuai dengan indikasi medis dan menjawab pertanyaan klinis terkait diagnosis (Lihat Bab 4). Panel-panel diagnosis EuroFlow divalidasi dengan titik akhir sensitivitas

100% dengan spesifisitas optimal atau spesifisitas 100% dengan sensitivitas optimal (van Dongen et al., 2012).

**Tabel 5.1.** Penentuan galur sel berdasarkan ekspresi antigen sesuai kriteria WHO<sup>5</sup>

<b>GALUR</b>	<b>ANTIGEN TERDETEKSI</b>
<b>Mieloid</b>	MPO positif Antigen monositik (minimal terdeteksi 2 antigen dari CD11c, CD14 atau CD64)
<b>Limfosit sel T</b>	CD3 sitoplasmik atau CD 3 permukaan
<b>Limfosit sel B</b>	CD19 kuat dengan minimal terdeteksi salah satu antigen berikut: CD79a, cyCD22, CD10 positif kuat. CD 19 dim dengan minimal terdeteksi 2 antigen berikut: CD79a, cyCD22, CD10 positif kuat.

Idealnya panel EuroFlow ini juga dapat menjadi acuan untuk pemeriksaan imunofenotiping kelainan hematologik, akan tetapi dengan adanya keterbatasan pembiayaan dan masih berjalannya pemerataan kompetensi, maka dikembangkan suatu panel *8-color* 3 tabung yang disesuaikan dengan kebutuhan diagnostik leukemia akut di Indonesia. Penanda penentu galur sel (Tabel 5.1.), ekspresi antigen tipikal, misal pada AML (Tabel 5.2) dan rekomendasi EuroFlow (Lihat Bab 4) digunakan sebagai acuan pada penyusunan panel yang dirancang menggunakan teknologi *dry-tube* (Tabel 5.3).

Tabel 5.2. Pola imunofenotiping pada LMA, modifikasi dari *Practical Flow Cytometry in Haematology Diagnosis* (Leach et al., 2013)

FAB <i>subtype</i>		WHO 2008	Ekspresi Antigen Tiptikal
AML M0	AML with minimal differentiation	Pada CD45 dim didapatkan penanda positif CD34, HLA-DR, CD38. Penanda CD 13 dan CD117 juga sering didapatkan positif. Penanda CD 33 positif pada 60% kasus.	
AML M1	AML without maturation	Penanda positif sama dengan M0, ditambah MPO positif	
AML M2	AML with maturation	Pada CD 45 dim umumnya didapatkan penanda positif : CD113 dan CD33. CD 117 dan HLA-DR dapat positif Penanda diferensiasi granulosit dapat ditemukan, seperti : CD11b, CD15, dan CD65	
AML M3	APL dengan t(15;17)(q22;q12); PML-RARA	SSC tinggi. Pada CD 45 dim dapat ditemukan penanda positif CD 117 (terkadang ditemukan positif dim), CD 13, CD 33 (terang), dan CD 64	
AML M4	Acute Myelomonocytic Leukemia AML with inv(16)(p13q22) atau t(16;16)(p13;q22); CBFB-MYH11* AML with t(9;11)(p22;q23) MLL1T3-MLL1* AML with mutates NPM1*	Dapat ditemukan penanda bias primitive (CD 34, HLA-DR, CD117) Didapatkan penanda positif CD13, CD33, CD65, MPO untuk duppopulasi granulositik. Didapatkan penanda CD4, CD14, dan CD64 untuk subpopulasi monobias/monositik. Ekspresi kuat CD 15 dan CD64 adalah penanda diferensiasi monositik.	
AML M5	Acute monoblastic and monocytic leukemia	Didapatkan penanda CD 34 positif pada 30% kasus, ekspresi CD 117 lebih banyak ditemukan, HLA-DR hampir selalu positif. Minimal ada 2 penanda monositik didapatkan (CD11b, CD11c, CD14, CD64, dan CD68) selain penanda myeloid (CD13,33,CD15, CD65).	
AML M6	Acute erythroid leukemia	Penanda populasi mieloblas didapatkan hampir menyerupai M0/M1. Penanda populasi erythroblas didapatkan GPPA positif, CD71 positif dim dan/atau CD117 positif. Pada eritroid leukemia murni hanya didapatkan eritroblas tanpa komponen mieloblas.	
AML M7	AML (Megalakarioblastik) dengan t(1;22)(p13;q13); RBM15-MLK11	Umumnya ditemukan penanda positif CD13, CD 33, CD 36, CD41, dan CD 61	

Untuk tabung orientasi, digunakan tabung ALOT yang mengadopsi panel EuroFlow, sedangkan tabung 2 (AL02) dan tabung 3 (AL03) mengadopsi panel yang sebelumnya telah digunakan secara luas di beberapa institusi yang mengerjakan imunofenotiping leukemia di Indonesia. Pada tabung ke-3 disediakan satu opsi menggunakan fluorokrom PE untuk mengakomodasi kasus-kasus dengan kecurigaan T-ALL, AML-M6 dan AML-M7. Contoh protokol kerja dapat dilihat pada Lampiran 1 dan strategi gating untuk panel ini dapat dilihat pada Lampiran 2.

**Tabel 5.3.** Panel 8-color 3 tube BD-Indonesia

<i>Tube</i>	Fluorokrom							
	V450	V500c	FITC	PE	PerCP-Cy5.5	PE-Cy7	APC	APC-H7
BD-ALOT (EuroFlow)	cy CD3	CD 45	cy MPO	cy CD79a	CD 34	CD 19	CD 7	s CD 3
AL02 (Myelomon)	HLA-DR	CD 45	CD64	CD13	CD 34	CD 117	CD 33	CD 14
AL03 (B/T/M6/M7)	CD 20	CD 45	CD5	<i>Open channel</i> CD15/ CD1a/ CD235a /CD71 /CD41	CD 4	CD 19	CD 10	CD 8

### 5.3. Aplikasi flowsitometri dalam penatalaksanaan leukemia akut

Pemeriksaan imunofenotiping leukemia selain untuk diagnosis, juga dapat diterapkan untuk deteksi infiltrasi leptomeningeal dan monitoring keberhasilan terapi. Infiltrasi sel blas ke organ lain kerap ditemukan pada leukemia akut. Salah satu modalitas pemeriksaan untuk mengetahui keterlibatan organ lain adalah pemeriksaan imunofenotiping dengan bahan cairan otak atau analisa cairan lain (cairan ascites atau pleura). Sensitivitas imunofenotiping lebih tinggi dibandingkan pemeriksaan sitomorfologi sendiri. Pada pemeriksaan sitomorfologi cairan otak diperlukan minimal 5% sel blas pada cairan hingga dapat terdeteksi, sedangkan pemeriksaan imunofenotiping dapat mendeteksi hingga 0,2%. Oleh karena itu penggabungan kedua modalitas diatas dapat meningkatkan sensitivitas dan spesifisitas deteksi keterlibatan organ lain pada leukemia akut (Leach et al., 2013).

Cairan tubuh yang mengandung jumlah sel sedikit seperti cairan serebrospinal dan vitreous dikategorikan dalam sampel jumlah sedikit (*small sample*). Jumlah sel yang sedikit menjadikan tantangan dalam penegakan diagnosis limfoma dan identifikasi sel leukemia akut. Penandaan sampel jumlah sedikit sangat tergantung pada jumlah sel dan viabilitas selnya. Viabilitas sel dapat dioptimalkan dengan menggunakan tabung koleksi berisi media kultur ditambahkan FCS 10% atau BSA 0,2% dan ditranspor ke laboratorium dalam 1 jam. Alternatif lain adalah penggunaan tabung koleksi *TransFix* yang dapat mengoptimalkan stabilisasi sel hingga 48 jam (Cherian et al., 2019; van Dongen et al., 2012).

Pemantauan keberhasilan terapi pada leukemia akut dilakukan dengan menilai *minimal residual disease* (MRD). MRD adalah sel blas

yang masih dapat ditemukan dalam tubuh setelah dilakukan terapi. Pemeriksaan *minimal residual disease* (MRD) diimplementasikan pada hampir semua protokol klinis untuk re-stratifikasi risiko sehingga terapi yang diberikan dapat disesuaikan. Sensitivitas pemeriksaan MRD metode flowsitometri lebih tinggi dibandingkan dengan pemeriksaan sitomorfologi. Sensitivitas MRD dengan berbagai metode adalah  $1:10^3$  sampai  $1:10^6$  sel leukosit, dibandingkan dengan deteksi sel MRD melalui morfologi yaitu 1:20 sel leukosit (Della Starza et al., 2019).

Tujuan pemeriksaan MRD pada leukemia akut adalah (i) penentuan status remisi; (ii) prediksi luaran dan penentuan terapi pasca remisi; (iii) identifikasi relaps, pemeriksaan penapisan pasca transplantasi sehingga memungkinkan intervensi dini; (iv) dapat digunakan sebagai *endpoint surrogate* pada uji klinis obat. Pemeriksaan MRD dapat dilakukan dengan berbagai metode. Metode pemeriksaan yang cukup terstandarisasi untuk pemeriksaan MRD adalah flowsitometri *multicolor* dan *polymerase chain reaction* (PCR) (Della Starza et al., 2019).

Pemeriksaan MRD menggunakan flowsitometri *multicolor* dengan menilai *leukemia-associated immunophenotype* (LAIP). LAIP pada ALL terdiri dari penanda spesifik ALL sesuai dengan tingkat maturasi disertai dengan penanda antigen yang tidak seharusnya diekspresikan. Apabila pasien tidak memiliki riwayat pemeriksaan sebelumnya, maka digunakan pendekatan pengenalan penanda leukemia yang berbeda dibandingkan dengan sel hematopoietik normal dengan menggunakan panel antibodi tertentu (Della Starza et al., 2019; Leach et al., 2013; Sara Raponi et al., 2011).

Standar pemeriksaan MRD dengan flowsitometri minimal menggunakan 4-6 warna. Sensitivitas dan spesifisitasnya dapat ditingkatkan dengan menggunakan flowsitometri 8-10 warna. Deteksi MRD dengan flowsitometri dapat diaplikasikan pada

90% kasus leukemia akut dan dapat mencapai sensitivitas  $10^{-3}$ - $10^{-4}$  (satu sel leukemia dalam 1000-10000 sel normal) (Della Starza et al., 2019; Raponi et al., 2011).

Penggunaan flowsitometer untuk pemeriksaan MRD memiliki beberapa keterbatasan yang perlu diperhatikan untuk menghindari positif atau negatif palsu. Regenerasi sel limfoid normal dapat menunjukkan ko-ekspresi antigen seperti pada ALL sehingga dapat menyebabkan interpretasi MRD positif palsu pada kasus ALL sel B. Sampel sumsum tulang hiposelular atau kondisi pergeseran fenotipe dapat menyebabkan kesalahan atau kesulitan interpretasi. EuroFlow telah melakukan optimasi dan standarisasi panel MRD, tetapi kompetensi dan pengalaman operator tetap diperlukan untuk melakukan analisis MRD dengan baik (Della Starza et al., 2019; Sara Raponi et al., 2011).

## **Daftar Pustaka**

Cherian, S., Hedley, B.D., Keeney, M., 2019. Common flow cytometry pitfalls in diagnostic hematopathology. *Cytometry* 96B, 449–463.

Della Starza, I., Chiaretti, S., De Propriis, M.S., Elia, L., Cavalli, M., De Novi, L.A., Soscia, R., Messina, M., Vitale, A., Guarini, A., Foà, R., 2019. Minimal Residual Disease in Acute Lymphoblastic Leukemia: Technical and Clinical Advances. *Front. Oncol.* 9, 726. <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.00726>

Dworzak, M.N., Buldini, B., Gaipa, G., Ratei, R., Hrusak, O., Luria, D., Rosenthal, E., Bourquin, J.-P., Sartor, M., Schumich, A., Karawajew, L., Mejstrikova, E., Maglia, O., Mann, G.,

Ludwig, W.-D., Biondi, A., Schrappe, M., Basso, G., on behalf of the International-BFM-FLOW-network, 2018. AIEOP-BFM Consensus Guidelines 2016 for Flow Cytometric Immunophenotyping of Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia: iBFM-FLOW STANDARDS FOR IMMUNOPHENOTYPING OF PEDIATRIC ALL. *Cytometry B Clin. Cytom.* 94, 82–93.  
<https://doi.org/10.1002/cyto.b.21518>

Hoelzer, D., Bassan, R., Dombret, H., Fielding, A., Ribera, J.M., Buske, C., 2016. Acute lymphoblastic leukaemia in adult patients: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann. Oncol.* 27, v69–v82.  
<https://doi.org/10.1093/annonc/mdw025>

Leach, M., Drummond, M., Doig Allyson, 2013. *Practical Flow Cytometry in Haematology Diagnosis*, 1st ed. Wiley Blackwell, England.

Raponi, S., Stefania De Propriis, M., Intoppa, S., Laura Milani, M., Vitale, A., Elia, L., Perbellini, O., Pizzolo, G., Foá, R., Guarini, A., 2011. Flow cytometric study of potential target antigens (CD19, CD20, CD22, CD33) for antibody-based immunotherapy in acute lymphoblastic leukemia: analysis of 552 cases. *Leuk. Lymphoma* 52, 1098–1107.  
<https://doi.org/10.3109/10428194.2011.559668>

van Dongen, J.J.M., Lhermitte, L., Böttcher, S., Almeida, J., van der Velden, V.H.J., Flores-Montero, J., Rawstron, A., Asnafi, V., Lécresse, Q., Lucio, P., Mejstrikova, E., Szczepański, T., Kalina, T., de Tute, R., Brüggemann, M., Sedek, L., Cullen, M.,



Langerak, A.W., Mendonça, A., Macintyre, E., Martin-Ayuso, M., Hrusak, O., Vidriales, M.B., Orfao, A., 2012. EuroFlow antibody panels for standardized n-dimensional flow cytometric immunophenotyping of normal, reactive and malignant leukocytes. *Leukemia* 26, 1908–1975.  
<https://doi.org/10.1038/leu.2012.120>



# BD OneFlow™ Solution pada Flow Cytometer BD FACSLyric™

Dirancang berdasarkan upaya riset dan validasi dari EuroFlow™ Consortium terhadap karakterisasi penyakit keganasan darah untuk hasil diagnostik yang lebih baik<sup>1</sup>, BD OneFlow™ Solution menghadirkan standar *immunophenotyping* leukemia dan limfoma selangkah lebih maju dari sebelumnya. Alat ini merupakan satu set lengkap yang terdiri dari reagen, protokol, dan *template assay* untuk persiapan *flow cytometer* dan pewarnaan (*stain*), pengambilan dan analisis spesimen pasien yang *reproducible* untuk *immunophenotyping* populasi sel normal dan *aberrant*. BD OneFlow Solution meningkatkan efisiensi dengan metode yang sederhana dan terstandar, lebih dapat diandalkan serta memberikan hasil yang akurat dan meyakinkan.<sup>2,3</sup> Pendekatan EuroFlow ini, dengan panel antibodi, pengaturan instrumen, prosedur laboratorium, dan perangkat lunak yang terstandar untuk *immunophenotyping flow cytometric* penyakit keganasan darah, telah kompatibel dengan Flow Cytometer BD FACSLyric.<sup>4</sup> BD OneFlow Solution sekarang dapat digunakan pada Flow Cytometer BD FACSLyric.

## Bagaimana cara Anda untuk mengoptimalkan efisiensi laboratorium?

<b>SASARAN</b>	Meningkatkan efisiensi dan utilisasi karyawan
<b>TANTANGAN</b>	Laboratorium diharapkan dapat mengelola bertambahnya beban kerja dengan tetap memastikan hasil pemeriksaan yang akurat dan sesuai standar.



### Efisiensi yang didapat dengan BD OneFlow Solution

- BD OneFlow LST, B-CLPD 1, PCST, PCD, dan ALOT merupakan reagen uji siap pakai untuk sekali pakai, mengeliminasi perlunya penggunaan pipet untuk mengambil antibodi, sehingga meminimalkan kesalahan operasional dan risiko diulangnya pemeriksaan
- Persiapan instrumen dan *compensation beads* dosis tunggal siap pakai mempermudah persiapan instrumen



### Optimisasi Karyawan

- Pengaturan instrumen dan *assay* yang terstandar serta *template* yang disediakan dapat meminimalkan kendala teknis dan kebutuhan pelatihan



## Keunggulan BD OneFlow™ Solution pada Flow Cytometer BD FACSLyric™



- **Persiapan Instrumen: 69%** pengurangan waktu per tahun yang diperlukan untuk persiapan dan 95% pengurangan waktu per tahun *hands-on*.<sup>2</sup>
- **Persiapan Harian: 74%** pengurangan harian langkah pengaturan manual dan 76% pengurangan waktu harian yang diperlukan untuk persiapan.<sup>2</sup>



- **74%** pengurangan biaya per tahun untuk persiapan *beads*<sup>2</sup>
- Menghilangkan perlunya penggunaan *assay beads* khusus dan *wash blood* yang dilisis untuk persiapan<sup>2</sup>

<sup>2</sup> Relatif terhadap Flow Cytometer BD FACSCanto II™ berdasarkan pengujian internal. Waktu yang diperlukan untuk memanaskan Flow Cytometer BD FACSLyric tidak dimasukkan karena bersifat *pre-programmable* dan tidak mempengaruhi waktu yang dibutuhkan operator. Performa setiap laboratorium dapat berbeda-beda.

## Bagaimana Anda memastikan hasil pemeriksaan akurat pada seluruh instrumen dan laboratorium?

<b>SASARAN</b>	Laboratorium perlu memastikan bahwa hasil pemeriksaan laboratoriumnya sama/sebanding terlepas dari instrumen, laboratorium dan geografinya
<b>TANTANGAN</b>	Ada banyak faktor yang dapat menimbulkan perbedaan akurasi dan keyakinan terhadap hasil pemeriksaan



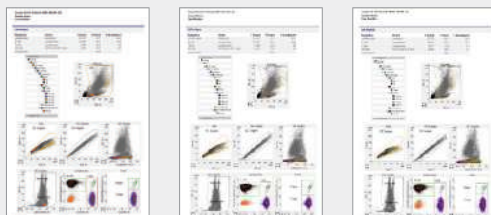
- Panel reagen 8-warna bersifat spesifik-penyakit yang disediakan, dibuat berdasarkan standar yang ditentukan oleh EuroFlow Consortium. " (EuroFlow) LST mendeteksi imunofenotipe sel B-, T-, atau NK yang *aberrant* pada 149/150 (99,4%) kasus B-CLPD<sup>1</sup> dan 78/83 (94%) kasus T/NK-CLPD dengan frekuensi secara keseluruhan 97,4%."<sup>1</sup>
- "Efisiensi orientasi sebesar 98,3% yang belum pernah terjadi sebelumnya untuk kasus *lineage* non-ambigu terlihat pada kombinasi (EuroFlow) ALOT dengan serangkaian 483 kasus leukemia akut yang baru terdiagnosis, yang diperiksa secara prospektif di sejumlah center berbeda."<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Penyakit limfoproliferatif kronik sel B

- Reagen BD OneFlow™, *template* pengambilan dan analisis, serta protokol yang terstandarisasi mendukung konsistensi hasil pemeriksaan

## Keunggulan BD OneFlow™ Solution pada Flow Cytometer BD FACSLyric™

- Standardisasi lintas-instrumen BD OneFlow Solution dan otomatisasi melalui Universal Setup menggunakan BD CS&T Beads dan BD FC Beads



Hasil yang ekuivalen terhadap sampel dari satu pasien yang diwarnai menggunakan BD OneFlow LST pada 3 Flow Cytometer BD FACSLyric yang berbeda

### Referensi:

1. Van Dongen, J.J., Lhermitte, L., Bottcher, S., dkk. EuroFlow antibody panels for standardized n-dimensional flow cytometric immunophenotyping of normal, reactive and malignant leukocytes. *Leukemia*. 2012; 26: 1908-1975.
2. Van der Velden, V., Flores-Montero, J., Perez-Andres, M., dkk. Optimization and testing of dried antibody tube: The EuroFlow LST and PIDOT tubes as examples. *Journal of Immunological Methods*. 2019;475:112287.
3. Maloney, E., Watson, H., Barge, D., dkk. Efficiency and Health Economic Evaluations of BD OneFlow™ Flow Cytometry Reagents for Diagnosing Chronic Lymphoid Leukemia. *Cytometry Part B (Clinical Cytometry)*. 2019.
4. EuroFlow Standard Operating Procedure (SOP) for Instrument Setup and Compensation BD FACSLyric Instruments Using 8-Color EuroFlow Assays. Version 1.8. 1 July 2019. Accessed 12 October, 2020. <https://app.euroflow.org/downloads/public>

Panel antibodi EuroFlow™ adalah properti milik EuroFlow Consortium dan tidak dapat direproduksi atau dipublikasikan tanpa izin tertulis sebelumnya oleh koordinator EuroFlow ([www.euroflow.org](http://www.euroflow.org)).

Produk telah memiliki Penandaan CE sesuai dengan European In Vitro Diagnostic Medical Device Directive 98/79/EC.

Flow Cytometer BD FACSLyric™ dan BD FACSCanto™ II merupakan Produk Laser Kelas 1.

Flow Cytometer BD FACSLyric™ bersama dengan BD FACSuite™ Clinical dan aplikasi BD FACSuite™ telah memiliki Penandaan CE sesuai dengan European In Vitro Diagnostic Medical Device Directive 98/79/EC.

Flow cytometer BD FACSCanto™ II memiliki Penandaan CE sesuai dengan European In Vitro Diagnostic Medical Device Directive 98/79/EC.

23-23451-00

BD Life Sciences, San Jose, CA, 95131, AS

[bdbiosciences.com](http://bdbiosciences.com)

BD, Logo BD, FACSCanto, FACSDiva, FACSLyric dan OneFlow adalah merk dagang milik Becton, Dickinson and Company atau afiliasinya. © 2020 BD. Seluruh hak cipta.



# BAB VI

## PRA-ANALITIK, ANALITIK, DAN PITFALLS PADA PEMERIKSAAN IMUNOFENOTIPING LEUKEMIA

Proses pemeriksaan flowsitometri dapat dibagi menjadi pra analitik, analitik, pasca analitik. Tahap pra analitik terdiri dari *set-up* instrumen, penanganan spesimen, dan proses spesimen; tahapan analitik terdiri dari persiapan sampel dan akuisisi data; dan tahapan pasca analitik terdiri dari analisis data, interpretasi, dan laporan. Pada setiap tahapan dilakukan kendali mutu atau pemantapan mutu. Pada setiap tahapan terdapat potensi sumber variabilitas yang bisa mempengaruhi pemeriksaan flowsitometri, dan dapat dilihat pada Tabel 6.1 (Leach et al., 2013; van Dongen et al., 2012).

**Tabel 6.1.** Potensi sumber variabilitas pada pemeriksaan flowsitometri

<b>Sumber variabilitas</b>	
<b>Sampel</b>	Adanya penundaan antara pengambilan sampel dan analisis Penyimpanan sampel tidak sesuai standar Persiapan sampel tidak sesuai standar
<b>SDM</b>	Perbedaan teknik pengerjaan Kepatuhan pelaksanaan standar prosedur pengerjaan sampel Kemampuan mengidentifikasi masalah
<b>Peralatan</b>	Variasi harian alat Penggunaan beberapa instrumen menyebabkan perbedaan hasil
<b>Reagen</b>	Perbedaan nomor lot Perubahan pada fluoresens Kontaminasi

## 6.1. Pra analitik

### 6.1.1. Formulir permintaan

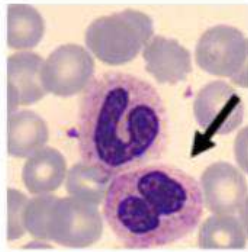
Keterangan klinis sangat diperlukan dalam melakukan interpretasi pemeriksaan imunofenotiping leukemia. Keterangan klinis harus tercantum dalam formulir permintaan pemeriksaan. Selain identitas pasien, formulir permintaan pemeriksaan sebaiknya juga dilengkapi dengan beberapa hal berikut: diagnosis/diagnosis sementara, obat yang dikonsumsi atau riwayat pemberian obat, tanggal dan waktu pengambilan spesimen, asal spesimen (sumsum tulang/darah tepi/jaringan limfoma dll), tujuan pemeriksaan fenotiping leukemia (diagnosis/evaluasi terapi), hasil hematologi rutin terbaru (hemoglobin, leukosit, trombosit), data lain yang berkaitan seperti hasil morfologi darah perifer/sumsum tulang, pewarnaan sitokimia, hasil sitogenetik, molekuler lainnya, pembesaran kelenjar getah bening atau organ. Keterangan tersebut diperlukan untuk membantu interpretasi flowsitometri (Baumgarth and Roederer, 2000; Leach et al., 2013). Contoh formulir dapat dilihat pada Lampiran 3.

### 6.1.2. Pengambilan dan penampungan sampel

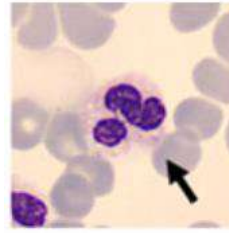
Spesimen pada pemeriksaan imunofenotiping leukemia akut adalah darah tepi, sumsum tulang, dan cairan tubuh (cairan otak, cairan pleura). Spesimen pemeriksaan darah tepi dapat menggunakan anti koagulan *ethylene diamine tetra acetic acid* (EDTA), *acid citrate dextrose*, dan sodium heparin. Antikoagulan yang umum digunakan adalah EDTA. Darah perifer dengan antikoagulan akan menunjukkan perubahan morfologi sel dalam 30 menit sejak pengambilan sampel. Evaluasi hapusan darah tepi dari darah EDTA yang disimpan pada suhu 4°C dan 20°C selama 4 jam

menunjukkan bahwa perubahan morfologi yang paling banyak ditemukan adalah fragmentasi sitoplasmik, degranulasi, dan/atau bentuk Pelger-Huet pada neutrofil, vakuolisasi pada monosit, serta *echinocytes* pada eritrosit. Perubahan seperti morfologi menyerupai Pelger-Huet atau hilangnya batas sitoplasmik (Gambar 6.1) dapat menyerupai kelainan pada *myelodysplastic syndrome* (MDS). Hal ini dapat menyebabkan kesalahan diagnosis (Vives-Corróns et al., 2014).

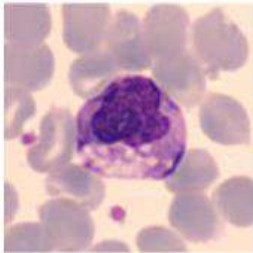
Bahan pemeriksaan sumsum tulang dapat menggunakan antikoagulan EDTA dan sodium heparin (Vives-Corróns et al., 2014). Rata-rata volume yang diperlukan untuk satu pemeriksaan imunofenotiping adalah 3-4 mL, kecuali pada kondisi hiposelular berat. Bahan disimpan pada suhu ruang, maksimal 48 jam sebelum dilakukan pemeriksaan. Kualitas hasil pemeriksaan lebih baik apabila sampel dilakukan preparasi dalam 24 jam setelah pengambilan sampel. Idealnya disertakan pemeriksaan hematologi rutin terbaru dan hapusan sumsum tulang tanpa fiksasi dan tanpa pewarnaan yang langsung dibuat pasca pengambilan sampel. Pembuatan *slide* langsung pasca pengambilan sampel untuk mendapatkan hasil morfologi yang baik (Leach et al., 2013; van Dongen et al., 2012). Sel dalam aspirat sumsum tulang lebih banyak dibandingkan darah perifer sehingga perubahan degeneratif dapat timbul lebih cepat (Vives-Corróns et al., 2014).



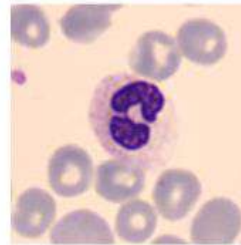
**PELGER - HÜET  
LIKE NEUTROPHILS**



**LOSS OF CYTO-  
PLASMIC MARGIN  
DEFINITION**



**VACUOLATED  
MONOCYTES**



**NEUTROPHIL  
DEGRANULATION**

**Gambar 6.1.** Perubahan morfologi yang banyak terjadi pada darah perifer dengan antikoagulan EDTA yang disimpan pada suhu 4°C dan 20°C selama 4 jam (Vives-Corróns et al., 2014)

Infiltrasi sel leukemia dapat terjadi ke berbagai organ antara lain otak dan paru. Oleh karena itu *liquor cerebro spinal* dan cairan pleura kerap dikirim untuk dilakukan pemeriksaan fenotiping leukemia pada pasien leukemia akut. Sel dalam cairan otak dapat mengalami kerusakan yang signifikan dalam 30 menit setelah pengambilan bahan. Hal tersebut dapat mempengaruhi evaluasi morfologi sel dan analisis sel yang sedikit pada flowsitometri. Sel dalam cairan otak dapat lebih stabil dengan menggunakan media seperti *Roswell Park Medical Institute* (RPMI) 1640, atau Transfix© (Cytomark, Buckingham UK). Evaluasi morfologi dan hitung sel cairan otak sebaiknya dilakukan dalam satu jam setelah pengambilan bahan

untuk menghindari kehilangan sel yang signifikan (Leach et al., 2013; van Dongen et al., 2012).

**Tabel 6.2.** Sampel pemeriksaan imunofenotiping

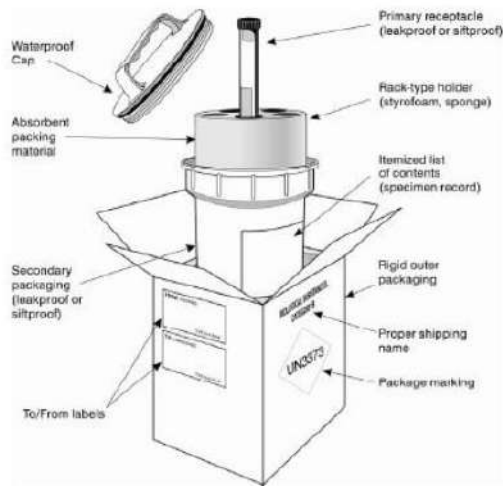
Sampel	Minimal Volume	Antikoagulan	Stabilitas	Keterangan
<b>Sumsum tulang</b>	2,7 mL	EDTA	48 jam, 15-25°C	Jika dirujuk ke laboratorium lain, sertakan hapusan sumsum tulang
<b>Darah tepi</b>	2,7 mL	EDTA	48 jam, 15-25°C	Jika dirujuk ke laboratorium lain, sertakan hapusan darah tepi
<b>Cairan pleura</b>	2 mL	Tanpa antikoagulan/EDTA	48 jam, 15-25°C	-
<b>Cairan otak</b>	2 mL	Tanpa antikoagulan/EDTA	< 6 jam, 15-25°C	-

### 6.1.3. Transpor sampel

Transport sampel imunofenotiping mengikuti prinsip *triple packaging system* sesuai standar WHO. Kemasan terdiri dari kemasan primer, sekunder, dan kemasan terluar. Wadah primer bersifat anti bocor (*leakproof*). Sebaiknya kemasan primer tersebut ditempatkan pada rak yang dapat memegang kemasan primer agar sampel tidak terguncang (Gambar 6.2). Kemasan kedua juga



harus memiliki sifat anti bocor. Kemasan luar harus memiliki kekuatan memadai, paling tidak salah satu permukannya memiliki dimensi minimal 100 mm x 100 mm. Sesuai dengan panduan WHO<sup>13</sup>, apabila sampel berupa cairan, maka material absorben diletakan di antara kemasan primer dan sekunder dalam kuantitas yang cukup untuk menyerap semua material dalam kemasan primer jika tumpah (World Health Organization, 2017). Barang yang mudah pecah ditempatkan sendiri pada kemasan sekunder, atau dibungkus secara individual/terpisah untuk mencegah kontak antar barang pecah-belah tersebut (Osei and Swift, 2022).



**Gambar 6.2.** *Triple packaging system* (Osei and Swift, 2022)

#### 6.1.4. Preparasi sampel

Pada saat melakukan persiapan sampel, petugas mengikuti prosedur kewaspadaan universal dengan menggunakan sarung tangan bebas serbuk dan jas laboratorium. Spesimen diletakkan di dalam tabung tertutup untuk menghindari terjadi tumpahan.

Apabila terjadi tumpahan maka dilakukan dekontaminasi menggunakan disinfektan atau cairan hipoklorit yang dicairkan.

Sebelum memulai tahapan persiapan sampel, lakukan inspeksi visual terhadap sampel yang akan diperiksa. Inspeksi dilakukan untuk melihat identitas pasien, jenis sampel (darah perifer, aspirat sumsum tulang, cairan tubuh, atau multipel), kondisi sampel seperti bekuan, hemolisis, volume kurang, dan penyimpanan sampel selama belum dikerjakan. Semua ketidaksesuaian dicatat, dan dituliskan dalam catatan hasil. Apabila memenuhi kriteria penolakan sampel maka sebaiknya sampel tidak dikerjakan. Jika tetap dikerjakan tulis catatan kondisi sampel yang mungkin dapat mempengaruhi hasil pemeriksaan (van Dongen et al., 2012; Wang, 2014).

## **6.2. Analitik**

Pada proses persiapan semakin banyak manipulasi dilakukan terhadap sampel maka semakin besar kemungkinan terjadi kerusakan sel. Oleh karena itu akan lebih baik dilakukan pemeriksaan hitung jumlah sel. Konsentrasi jumlah sel yang optimal untuk pemeriksaan flowsitometri adalah  $1.2-2 \times 10^6$  sel/tabung. Sel neoplastik lebih rentan oleh karena itu lebih mudah mengalami kerusakan karena proses pencucian dan sentrifugasi (Cherian et al., 2019; Leach et al., 2013).

Pemilihan prosedur dan reagen pewarnaan yang tepat sebaiknya memenuhi kriteria berikut: (i) Pewarnaan populasi mayoritas leukosit memberikan CV rendah pada FSC dan SSC; (ii) Perbedaan nilai rerata yang besar untuk kanal FSC dan SSC pada populasi leukosit mayoritas; (iii) jumlah sel yang hilang minimal; (iv) preservasi fluorokrom; (v) tidak ada pengaruh terhadap stabilitas fluorokrom tandem; (vi) latar pewarnaan

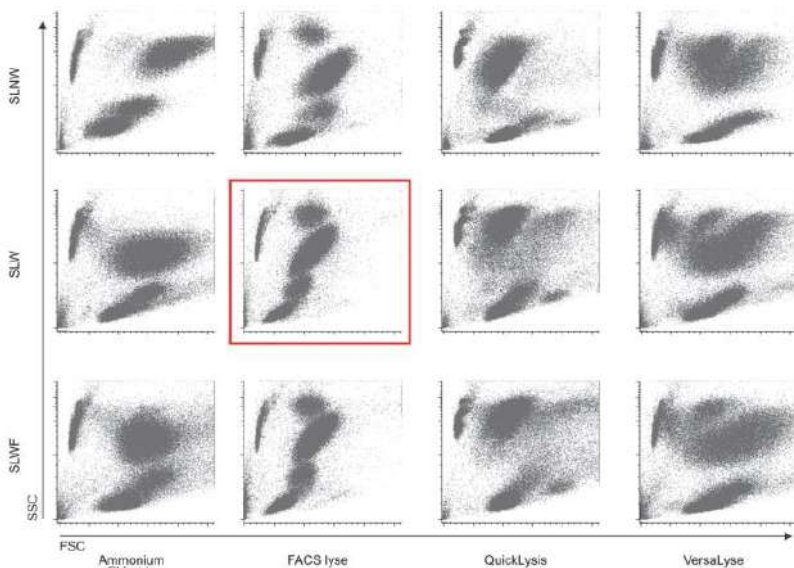
minimal; (vii) variasi inter-laboratorium rendah; (viii) penggunaan mudah dan cepat.

Pewarnaan sel dapat dilakukan pada penanda permukaan sel dan intrasel. Ada tiga metode pewarnaan permukaan sel yaitu *stain-lyse-wash* (SLW), *stain-lyse-wash-fix* (SLWF) dan *stain-lyse-no wash* (SLNW) (van Dongen et al., 2012).

Tahap lisis pada proses pewarnaan mengacu pada pelisisan sel eritrosit pada sampel. EuroFlow telah melakukan evaluasi pada berbagai metode pewarnaan dan berbagai jenis larutan pelisis eritrosit. Terdapat beberapa larutan pelisis eritrosit (*erythrocyte lysing solution*) yang beredar di pasaran, antara lain amonium klorida, FACS *lysing solution*, QuickLysis, dan Versalysis. Berdasarkan hasil evaluasi tersebut didapatkan beberapa poin berikut: (a) Pada perbandingan kualitatif grafik *scatter* populasi sel darah perifer, FACS *lysing solution* dan amonium klorida mampu membedakan populasi mayoritas dengan baik; (b) Nilai CV pada FSC dan SSC pada prosedur pewarnaan SLNW menunjukkan CV lebih rendah dan homogen dibandingkan prosedur pewarnaan lain, kecuali pada penggunaan FACS *lysing solution* di mana CV FSC dan SSC lebih baik dengan penambahan langkah mencuci di akhir prosedur (Gambar 6.3). Jumlah sel yang didapatkan pada prosedur pewarnaan SLNW paling banyak dibandingkan metode lainnya. Kehilangan sel neutrofil dan limfosit subset didapatkan pada prosedur pewarnaan SLW dan SLWF, kehilangan sel paling sedikit didapatkan pada penggunaan FACS *lysing* dibandingkan larutan pelisis eritrosit lainnya (Leach et al., 2013; van Dongen et al., 2012).

Langkah protokol pewarnaan *stain-lyse-wash* yang umum dikerjakan adalah sebagai berikut (1) 50  $\mu$ L darah perifer dicampur dengan antibodi terkonjugasi. Volume antibodi yang diberikan sesuai dengan rekomendasi pabrikan/panel spesifik

yang telah dioptimasi dan/atau dilakukan titrasi. Total volume yang diinginkan adalah 100  $\mu$ L, dapat ditambahkan PBS+0,5%BSA+0,09%NaN<sub>3</sub> untuk mencapai total volume tersebut. Kemudian inkubasi selama 15 menit, suhu ruang, dalam ruang gelap; (2) Larutan lisis ditambahkan ke dalam tabung reaksi, volume yang ditambahkan sesuai instruksi pabrikan. Selanjutnya tabung reaksi kembali diinkubasi selama 10 menit, suhu ruang, dalam ruang gelap; (3) Sentrifus tabung reaksi selama 5 menit pada 540g. Buang supernatant kemudian resuspensi pelet dalam 2 mL PBS+0,5% BSA; (4) Sentrifus kembali tabung reaksi selama 5 menit pada 540g, kemudian resuspensi pelet dalam 250  $\mu$ L PBS+0,5% BSA (Lampiran 1).



**Gambar 6.3.** Perbedaan karakteristik grafik *scatter* populasi mayoritas leukosit darah tepi pada berbagai protokol pewarnaan dan cairan lisis.

CV grafik *scatter* paling rendah pada metode *stain-lyse-wash* dengan menggunakan cairan lisis FACS *lyse* (kotak merah) (van Dongen et al., 2012)

Protokol pewarnaan SLW, SLWF, dan SLNW secara keseluruhan sama, tetapi ada perbedaan yang harus diperhatikan. Perbedaan protokol SLW dan SLWF adalah pada metode SLWF resuspensi hasil pelet terakhir dilakukan dalam PBS yang mengandung 0,5% paraformaldehyde, sedangkan pada metode SLW resuspensi hasil pelet terakhir dilakukan menggunakan PBS+0,5%BSA. Untuk protokol SLNW, persiapan sampel selesai pada langkah inkubasi kedua, yaitu inkubasi dengan cairan lisis selama 10 menit pada suhu ruang dalam ruang gelap, tidak ada prosedur pencucian sesudahnya (van Dongen et al., 2012).

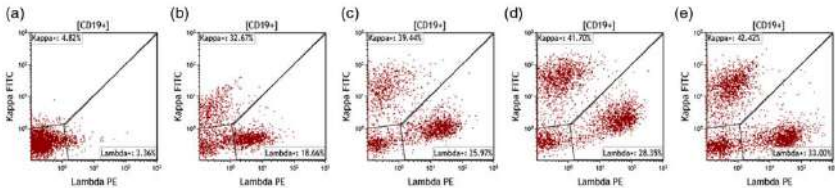
### **6.3. *Pitfalls* flowsitometri dalam diagnosis kelainan hematologi**

#### **6.3.1. Masalah pra analitik**

Sampel untuk pemeriksaan flowsitometri harus dilakukan inspeksi untuk menilai kondisi sampel. Sampel dengan bekuan atau hemolisis dapat tidak merepresentasikan kondisi klinis yang ingin diketahui. Kontaminasi darah perifer pada sampel sumsum tulang dapat menyebabkan peningkatan sel granulosit matur. Kondisi-kondisi di atas harus ditulis laporan hasil karena dapat mempengaruhi interpretasi pemeriksaan (Cherian et al., 2019; Kluin-Nelemans et al., 1996; Leach et al., 2013).

Viabilitas sel kerap menjadi masalah utama pada sampel dengan jumlah sel sedikit, oleh karena itu disarankan untuk menempatkan sampel pada media preservatif segera setelah sampel diambil. Media yang dapat digunakan seperti media RPMI 1640 atau media 199. Grafik FSC dan SSC digunakan untuk mengeluarkan *debris* dari populasi yang ingin diolah serta memberikan perkiraan kasar viabilitas sel (Cherian et al., 2019).

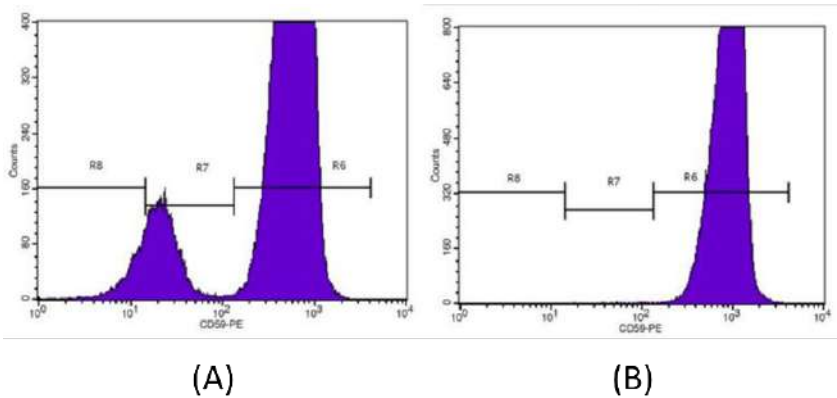
Panel leukemia kronik perlu mendeteksi imunoglobulin permukaan, pada panel ini langkah pencucian memegang peranan penting disarankan minimal melakukan 2 kali pencucian menggunakan *phosphate buffer saline* sebelum dilakukan pewarnaan untuk menyingkirkan antibodi *cytophilic*. Gambar 6.4 menunjukkan pengaruh langkah pencucian pada pewarnaan kappa-lambda permukaan pada bahan sumsum tulang (Cherian et al., 2019).



**Gambar 6.4.** Pencucian inadeguat pada pemeriksaan antibodi kappa-lambda permukaan sel pada populasi CD 19 positif. Jumlah pencucian meningkat dari kiri ke kanan; (a) tidak dilakukan pencucian; (b) satu kali pencucian; (c) dua kali pencucian; (d) tiga kali pencucian dan (e) 3 kali pencucian dan 10 menit inkubasi dengan 5% albumin. Tampak peningkatan sinyal antibodi rantai ringan seiring dengan penambahan pencucian.<sup>14</sup>

Pada langkah pewarnaan permukaan yang direkomendasikan oleh EuroFlow dianjurkan memasukkan sejumlah volume antibodi penanda permukaan ke dalam tabung berisi sampel. Apabila dilakukan sebaliknya, dapat terjadi pencampuran tidak sempurna antara antibodi dan sampel, sehingga terdapat bagian sampel yang tidak terwarnai. Hal tersebut tidak hanya ditemui pada pewarnaan leukosit, namun juga eritrosit. Gambar 6.5 menunjukkan terjadinya pewarnaan tidak sempurna pada pemeriksaan PNH. Panel PNH mendeteksi populasi eritrosit yang mengalami defisiensi *glycosyl phosphatidylinositol* (GPI). Pewarnaan yang tidak komplit dapat menyebabkan kesalahan

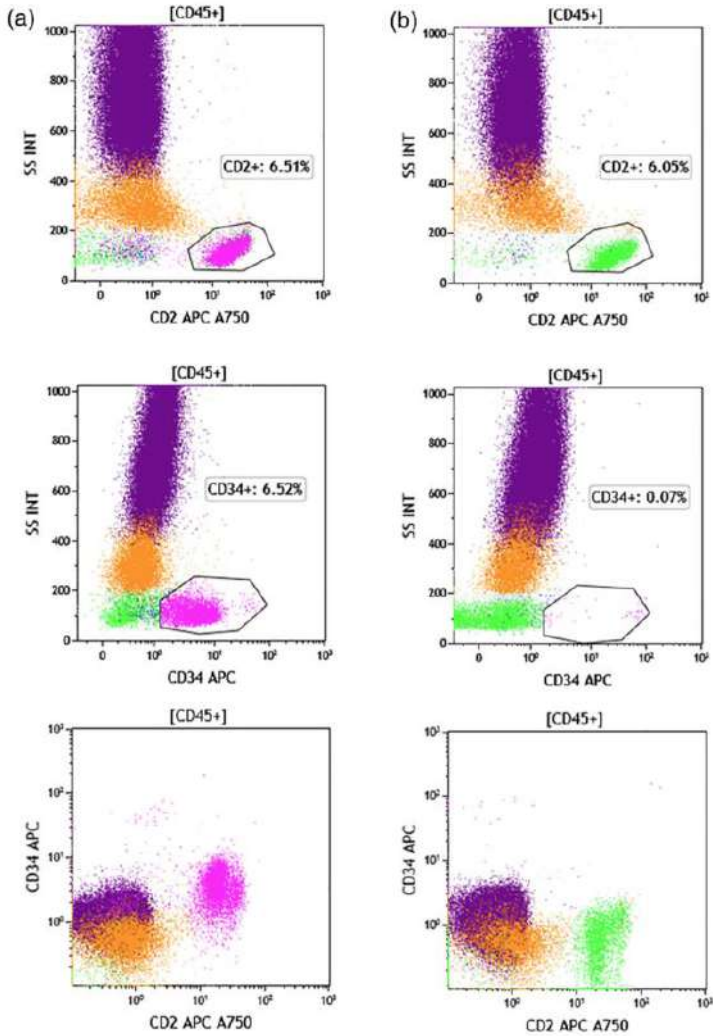
interpretasi dengan didapatkannya populasi eritrosit dengan defisiensi GPI, yang tampak sebagai populasi negatif.



**Gambar 6.5.** Pewarnaan tidak sempurna pada gambar (A) menunjukkan populasi eritrosit dengan defisiensi GPI sehingga ekspresi CD59 negatif. Pengulangan pewarnaan sampel yang sama menunjukkan populasi eritrosit dengan CD59 negatif tidak ada. Proses pewarnaan tidak sempurna dapat mempengaruhi interpretasi hasil (Cherian et al., 2019).

Penggunaan flowsitometri saat ini berkembang sangat pesat terutama dengan tersedianya berbagai fluorokrom baru dan *tandem-dyes*. Hal tersebut memungkinkan analisis menggunakan 9-10 antibodi dalam 1 tabung. Namun terdapat hal yang perlu diperhatikan pada penggunaan *tandem-dye* yaitu terjadinya pemecahan antibodi (*antibody breakdown*), contohnya APC-alexa 750 yang mengalami pemecahan pewarna menjadi APC. Gambar 6.6, menunjukkan adanya sel T dengan CD2 positif menggunakan fluorokrom APC-a750 muncul sebagai populasi CD34 positif dengan pewarnaan APC karena pemecahan pewarna tandem APC-a750. Langkah yang dapat dilakukan untuk mencegah *antibody breakdown* adalah melindungi antibodi dari paparan sinyal

langsung, menyimpan fluorokrom dalam botol gelap, dan segera memasukkan kembali zat fluorokrom ke lemari pendingin pada saat persiapan sampel (Cherian et al., 2019).



**Gambar 6.6.** *Tandem-dye* mengalami kerusakan. APC-a750 (konjugasi dengan anti CD2) diduga mengalami kerusakan sehingga terbaca sebagai APC. Pada gambar (a) Sel T dengan CD2 positif berwarna magenta dan pada gambar (b) berwarna hijau. Gambar (a)



menunjukkan sinyal positif palsu pada kanal APC, sehingga memberikan kesan sebagai populasi sel T ko-ekspresi CD34 yang terkonjugasi dengan APC. Dilakukan pengulangan terhadap sampel yang sama dengan menggunakan anti CD2 APC-a750 vial baru (gambar (b)). Pada sampel yang dilakukan pengulangan didapatkan sel T dengan ekspresi CD2 namun tidak mengekspresikan CD34 positif (Cherian et al., 2019).

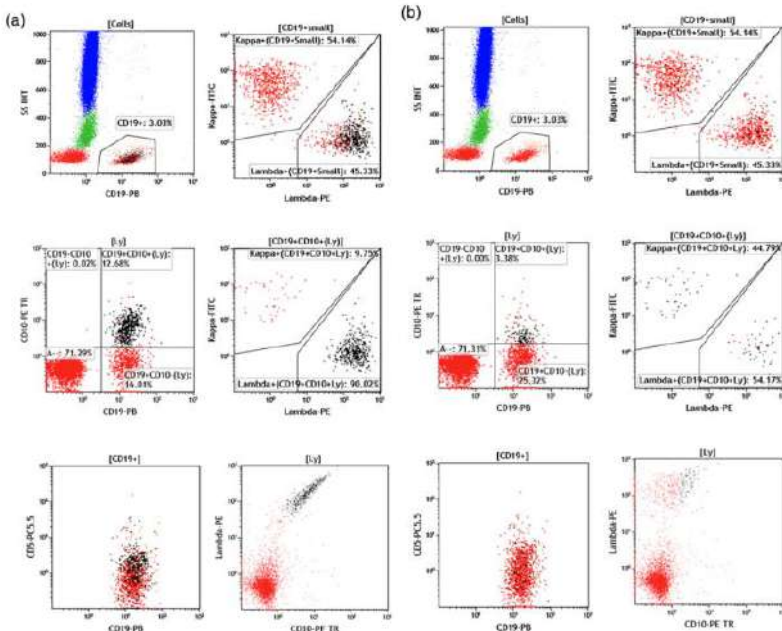
### 6.3.2. Masalah analitik

Sebelum melakukan pemeriksaan terhadap sampel pasien, perlu dipastikan alat flowsitometri sudah optimal, *photomultiplier tubes* sudah optimal untuk mendeteksi sinyal, dan kompensasi pada instrumen telah dilakukan untuk menghilangkan sinyal yang tidak diinginkan dari kanal lain. Gambar 6.7 menggambarkan potensi kesalahan interpretasi karena kompensasi tidak baik. Kompensasi yang tidak baik pada pemeriksaan tersebut dapat menyebabkan hasil tersebut dapat dilaporkan sebagai populasi sel B dengan restriksi rantai ringan lambda, karena kompensasi dari kanal PE *Texas red* tidak baik. Setelah dilakukan *set-up* kompensasi didapatkan sel B poliklonal (Cherian et al., 2019; Kluin-Nelemans et al., 1996).

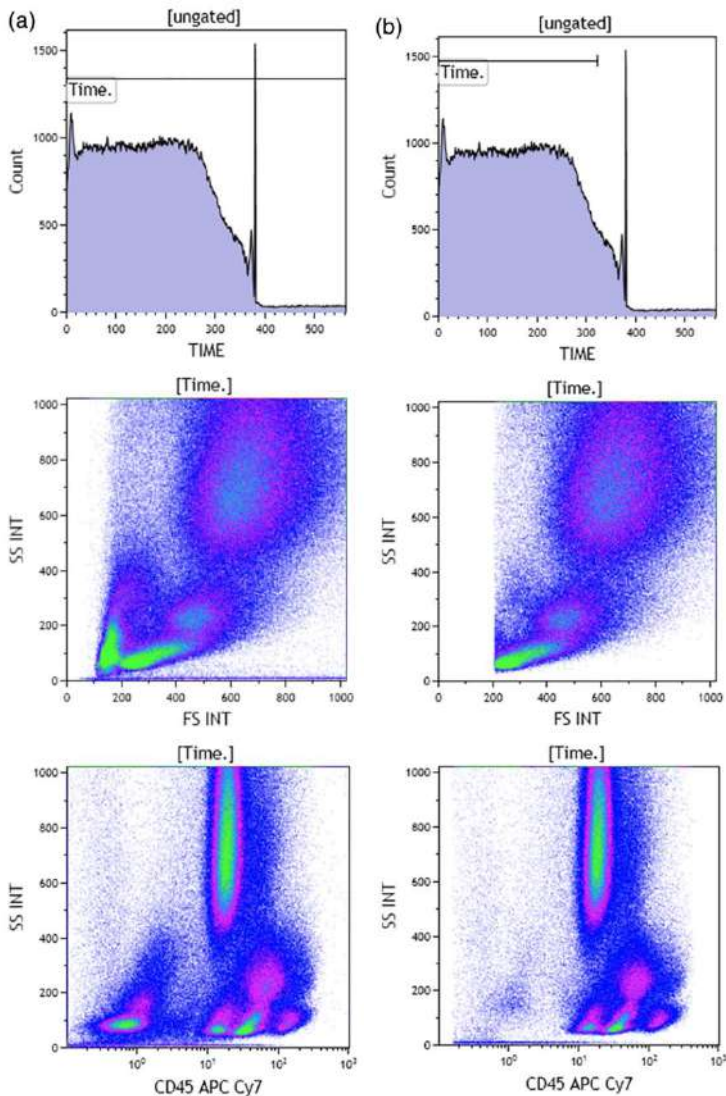
Saat ini hampir seluruh flowsitometri memiliki parameter "*time*". *Gating* pada *time* akan sangat bermanfaat untuk memastikan data yang ikut dalam analisis sudah tidak menyertakan sampel yang mengalami interupsi baik karena adanya gelembung udara pada *tubing* atau sampel habis. Pengaruh *gating* pada parameter *time* dapat dilihat pada Gambar 6.8 (Cherian et al., 2019).

Selain parameter *time*, terdapat parameter *time of flight* (TOF) atau grafik FSC dan *forward amplitude* (*height*), di mana *doublet* dapat terdeteksi sehingga dilakukan *gating* untuk mengeksklusi *doublet*. *Doublet cell* dapat ditemukan pada sampel jaringan yang tidak mengalami disintegrasi dengan baik, pada beberapa jenis

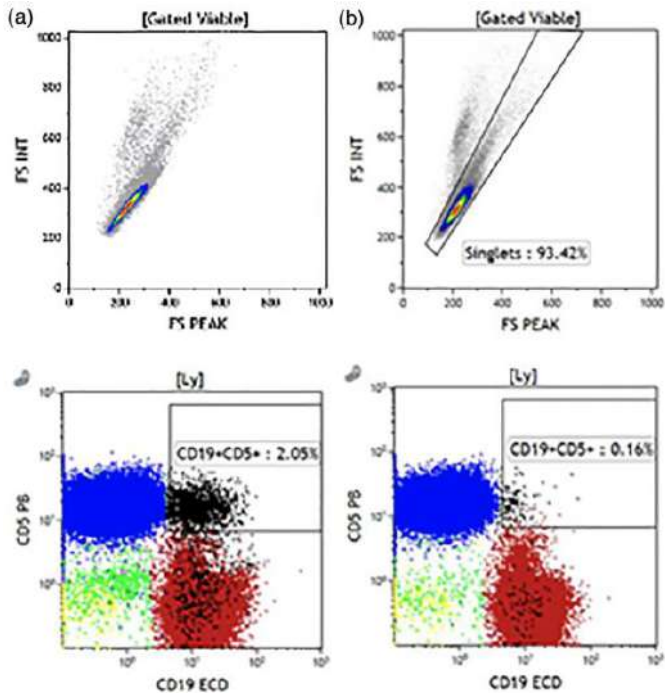
keganasan sel B, dan ketika digunakan *flow rate* tinggi. Gambar 6.9 menunjukkan bagaimana *doublet* dapat terlihat sebagai populasi abnormal yang mengekspresikan CD19 dan CD5, dan setelah *doublet* disingkirkan populasi abnormal tersebut tidak ditemukan lagi (Cherian et al., 2019).



**Gambar 6.7.** Gambar (a) menunjukkan apa yang dapat terjadi apabila menggunakan fluorokrom yang berdekatan dengan kompensasi yang tidak baik. (a) Terlihat populasi positif CD19 dan CD 10 dominasi positif lambda, dengan perbandingan kappa:lambda adalah 1:9 (populasi berwarna hitam). Sehingga disimpulkan sebagai sel B yang mengalami restriksi rantai ringan lambda. Namun pada grafik lambda-PE dengan CD10-PE TR terlihat sel yang terbaca pada kanal PE adalah sinyal dari kanal PE-TR yang masuk (*spill over*) ke kanal PE. Populasi berbentuk diagonal (lingkaran kuning) merupakan salah satu tanda kompensasi yang tidak baik. (b) pemeriksaan setelah dilakukan koreksi terhadap kompensasi, terlihat tidak terdapat restriksi rantai ringan pada populasi sel B (Cherian et al., 2019)



**Gambar 6.8.** Parameter *time* digunakan bila akuisisi sampel terinterupsi. Pada histogram (a) dan (b) terlihat data akuisisi terinterupsi pada detik ke-400. Data (a) menggunakan seluruh data yang diakuisisi, sedangkan data (b) hanya menggunakan data pada saat akuisisi stabil. Dampak dari perbedaan *gating* pada parameter *time* terlihat pada grafik FSC vs SSC dan FSC vs CD45. Pada gambar (a) terlihat banyak *debris* (Cherian et al., 2019)



**Gambar 6.9.** *Doublet* menyebabkan tampilan populasi abnormal (CD19+CD5+) pada gambar (a). Populasi abnormal pada gambar (b) tidak ada setelah dilakukan *gating* untuk mengeluarkan sel *doublet* (Cherian et al., 2019)

### 6.3.3. Masalah interpretasi data

Selain faktor pra-analitik dan analitik, terdapat hal-hal yang harus diperhatikan dalam interpretasi data sehingga menghasilkan interpretasi yang akurat dan konsisten. Dasar flowsitometri untuk mengenali sel neoplastik hematopoetik adalah prinsip bahwa sel leukemia memiliki imunofenotiping berbeda dibandingkan dengan sel darah normal. Sifat ini memungkinkan sel leukemia dianalisis menggunakan flowsitometri. Karakter ekspresi antigen pada hematopoiesis normal berubah sesuai dengan tingkat pematangan sel. Pola ekspresi antigen sel hematopoietik normal juga bervariasi tergantung tipe sel (Cherian et al., 2019).

Populasi neoplastik memiliki karakteristik morfologi dan imunofenotiping abberant. Populasi seperti itu dapat tidak tercakup apabila menggunakan strategi *gating* yang umum digunakan. Strategi *gating* yang umum digunakan sebagai titik awal investigasi progenitor abnormal pada leukemia akut adalah menggunakan CD45 dan SSC, untuk menentukan CD45 positif *dim*. Namun, leukemia promielositik akut umumnya memiliki karakteristik SSC meningkat, sehingga kerap tidak masuk dalam *gating* yang digunakan untuk mendefinisikan *blast* pada grafik CD45 dan SSC. Karakteristik morfologi dan ekspresi antigen populasi neoplastik dapat mengalami perubahan, sehingga menginterferensi strategi *gating* standar. Keganasan sel T, dapat menunjukkan karakteristik ekspresi antigen abnormal atau penurunan ekspresi antigen sel T, pada beberapa kasus didapatkan CD3 negatif. Oleh karena itu pada saat melakukan interpretasi panel leukemia akut sebaiknya tidak membatasi investigasi populasi blas hanya berdasarkan grafik SSC dengan CD45, tapi juga menggunakan beberapa penanda yang umum diekspresikan oleh sel progenitor (Cherian et al., 2019; Kluin-Nelemans et al., 1996).

Saat melakukan identifikasi populasi abnormal dengan flowsitometer, harus selalu dipikirkan apakah populasi terdeteksi dari spesimen tersebut benar merupakan produk dari proses keganasan. Kondisi klinis dan morfologi sel tetap harus menjadi pertimbangan dalam melakukan interpretasi data flowsitometri. Terdapat beberapa kondisi yang dapat menyebabkan populasi limfosit tampak abnormal tapi tidak berkaitan dengan kondisi leukemia atau limfoma. Kondisi inflamasi dapat menunjukkan populasi sel B atau sel T reaktif yang bersifat monotipe. Wood dkk, menggambarkan B sel dengan kecondongan rantai ringan atau monotipe pada hiperplasia folikular. Sel T reaktif juga dapat

ditemui pada infeksi kronik. Contoh kasus, pada stimulasi antigen kronik karena infeksi *cytomegalovirus* (CMV), sel T CD4 ko-ekspresi CD8 lemah dengan CD56. Beberapa kondisi lain telah disebutkan oleh WHO, salah satunya adalah *monoclonal B-cell lymphocytosis*, insidensinya meningkat sesuai usia dan umumnya imunofenotiping-nya menyerupai *chronic lymphocytic leukemia/small lymphocytic leukemia*. Begitu juga *follicular neoplasia* dan *in situ mantle cell neoplasia* yang menunjukkan karakter imunofenotiping menyerupai *lymphoma follicular* dan *mantle cell lymphoma*. Kondisi keganasan non hematopoietik juga perlu dipertimbangkan dalam melakukan interpretasi data flowsitometri. Keganasan non hematopoietik dapat mengekspresikan satu atau lebih penanda hematopoietik, contohnya CD56. CD56 umum diekspresikan oleh tumor solid yang berasal dari sel epitel. Saat melakukan interpretasi data flowsitometri harus selalu dipertimbangkan kondisi klinis pasien dan morfologi sel. Apabila hal tersebut dilakukan diharapkan dapat membedakan kondisi reaktif dengan lymphoma/leukemia dan keganasan non hematopoietik (Cherian et al., 2019; Wood, 2015).

Pola ekspresi antigen pada pasien dengan atau pasca terapi tidak selalu sama dengan pola normal. Karakteristik perubahan antigen yang diekspresikan tergantung tipe terapi yang diberikan. Regimen kemoterapi yang umum diberikan menghasilkan kematian non-spesifik pada sel yang bermitosis cepat, menyebabkan kondisi pansitopenia dan reduksi selularitas sumsum tulang dalam beberapa hari atau minggu pasca terapi. Pasien yang mendapatkan *targeted therapy*, tidak hanya mengubah pola dari sel normal yang kerap digunakan sebagai sel pembanding, namun juga mengubah imunofenotiping populasi neoplastik. Perubahan yang umum ditemui adalah hilangnya ekspresi antigen tertarget oleh terapi. Penggunaan terapi anti

CD19 akan memperbesar kemungkinan populasi progenitor yang akan muncul jika pasien mengalami relaps bersifat CD19 negatif, sedangkan CD19 positif adalah *gating* yang umum digunakan untuk melakukan evaluasi sel B (Cherian et al., 2019). Perubahan ekspresi antigen pasca pemberian terapi dapat dilihat pada Lampiran 4.

## Daftar Pustaka

Cherian, S., Hedley, B.D., Keeney, M., 2019. Common flow cytometry pitfalls in diagnostic hematopathology. *Cytometry* 96B, 449–463.

Kluin-Nelemans, J.C., Van Wering, E.R., Van 't Veer, M.B., Van Der Schoot, C.E., Adriaansen, H.J., Van Der Burgh, F.J., Gratama, J.W., 1996. Pitfalls in the immunophenotyping of leukaemia and leukaemic lymphomas: survey of 9 years of quality control in The Netherlands. *Br. J. Haematol.* 95, 692–699. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2141.1996.d01-1962.x>

Leach, M., Drummond, M., Doig Allyson, 2013. *Practical Flow Cytometry in Haematology Diagnosis*, 1st ed. Willey Blackwell, England.

Raponi, S., Stefania De Propriis, M., Intoppa, S., Laura Milani, M., Vitale, A., Elia, L., Perbellini, O., Pizzolo, G., Foá, R., Guarini, A., 2011. Flow cytometric study of potential target antigens (CD19, CD20, CD22, CD33) for antibody-based immunotherapy in acute lymphoblastic leukemia: analysis of 552 cases. *Leuk. Lymphoma* 52, 1098–1107. <https://doi.org/10.3109/10428194.2011.559668>

van Dongen, J.J.M., Lhermitte, L., Böttcher, S., Almeida, J., van der Velden, V.H.J., Flores-Montero, J., Rawstron, A., Asnafi, V., Lécresse, Q., Lucio, P., Mejstrikova, E., Szczepański, T., Kalina, T., de Tute, R., Brüggemann, M., Sedek, L., Cullen, M., Langerak, A.W., Mendonça, A., Macintyre, E., Martin-Ayuso, M., Hrusak, O., Vidriales, M.B., Orfao, A., 2012. EuroFlow antibody panels for standardized n-dimensional flow cytometric immunophenotyping of normal, reactive and malignant leukocytes. *Leukemia* 26, 1908–1975.  
<https://doi.org/10.1038/leu.2012.120>

Vives-Corrons, J.-L., Briggs, C., Simon-Lopez, R., Albareda, S., de la Salle, B., Flegar-Meatrui, Z., Nazor, A., Guyard, A., Lipsic, T., Nagai, Y., Patiu, M., Piqueras, J., Capel, M.J., Van Blerk, M., Wang, J., Marzac, C., 2014. Effect of EDTA-anticoagulated whole blood storage on cell morphology examination. A need for standardization. *Int. J. Lab. Hematol.* 36, 222–226.  
<https://doi.org/10.1111/ijlh.12170>

Wirawan, R., 2011. , in: *Pemeriksaan Laboratorium Hematologi, Pra Analitik Pemeriksaan Hematologi*. Badan Penerbit Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, pp. 3–15.

Wood, B.L., 2015. Flow cytometry in the diagnosis and monitoring of acute leukemia in children. *J. Hematop.* 8, 191–199. <https://doi.org/10.1007/s12308-014-0226-z>



# BAB VII

## PENUTUP

Dalam buku panduan ini telah dibahas berbagai aspek dari leukemia mencakup aspek epidemiologi, diagnosis, dan imunofenotiping pada leukemia. Telah disampaikan pula panduan rujukan penggunaan panel marker baik panel dasar imunofenotiping leukemia, panel penyaring, dan panel konfirmasi. Panel penyaring dirancang berdasarkan temuan awal gejala klinis atau laboratorik, antara lain limfositosis, lesi tulang, dan plasmasitosis pada sumsum tulang, serta kecurigaan adanya sel hematologi ganas pada sampel dengan hitung sel yang sangat rendah, seperti spesimen aspirasi jarum halus, cairan otak, cairan vitreus, dan lainnya. Panel lanjutan dirancang untuk konfirmasi lini hematopoietik yang terlibat dan tingkat maturasinya, deteksi fenotipe campuran, atau deteksi *leukemia associated antigen* (LAA) sebagai dasar (*baseline*) deteksi MRD, atau untuk identifikasi target terapi. Selain itu pada panel *extended* juga dapat ditambahkan penanda untuk deteksi lini eritroid, dan megakariositik.

Dari uraian tersebut tampak bahwa imunofenotiping multiparameter flowsitometri merupakan bagian penting dari diagnosis terpadu pasien dengan dugaan keganasan hematologi. Mengingat pentingnya imunofenotiping dalam diagnosis keganasan hematologi, diharapkan terbitnya buku ini dapat menjadi panduan bagi sejawat yang bertugas di laboratorium maupun klinisi dalam penanganan dan tata laksana pasien, sekaligus merupakan standar pelayanan agar hasil dan pelaporan pemeriksaan imunofenotiping dapat diharmonisasikan antar fasilitas pelayanan kesehatan/RS. Penetapan diagnosis yang tepat

merupakan tugas *provider* dalam memenuhi hak pasien, sesuai dengan era pelayanan kesehatan berfokus pada pasien atau lebih dikenal dengan istilah *patient center care*. Semoga bermanfaat.

# Lampiran 1. Standar prosedur persiapan sampel dan pewarnaan menurut EuroFlow

## A. Pewarnaan penanda permukaan

1. Antibodi terhadap penanda permukaan ditambahkan sesuai dengan volume yang direkomendasikan ke dalam tabung reaksi berisi 50  $\mu$ L sampel.
2. Jika diperlukan, tambahkan PBS+0,5% BSA+0,09% NaN<sub>3</sub> hingga volume akhir 100  $\mu$ L per tabung. Lakukan homogenisasi.
3. Inkubasi selama 15 menit pada suhu ruang dalam ruang gelap.
4. Tambahkan 2mL 1x larutan FACS Lysing (10x larutan FACS *lysing* diencerkan 1/10 vol/vol dengan *distilled water* (dH<sub>2</sub>O)). Lakukan homogenisasi.
5. Inkubasi selama 10 menit pada suhu ruang dalam ruang gelap.
6. Sentrifus selama 5 menit pada 540g.
7. Buang supernatan tanpa mengganggu pelet sel. Sisakan volume residu kurang lebih 50  $\mu$ L pada setiap tabung.
8. Tambahkan 2mL PBS+0,5% BSA+0,09% NaN<sub>3</sub> ke dalam tabung berisi pelet sel, homogenkan.
9. Sentrifus selama 5 menit pada 540g.
10. Buang supernatan tanpa mengganggu pelet sel. Sisakan volume residu kurang lebih 50  $\mu$ L pada setiap tabung.
11. Re-suspensi pelet sel dengan 200  $\mu$ L PBS+0,5% BSA+0,09% NaN<sub>3</sub>.

12. Akuisisi sel setelah pewarnaan atau jika tidak segera diakuisisi simpan pada suhu 4°C sampai 3 jam sebelum akuisisi.

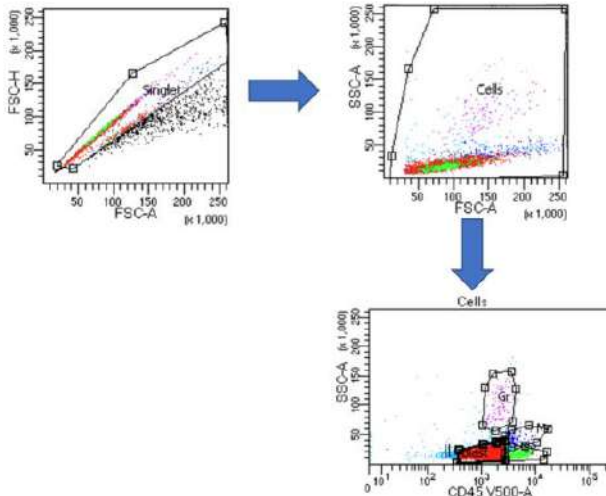
## **B. Kombinasi pewarnaan intraselular dan penanda permukaan**

1. Antibodi terhadap penanda permukaan ditambahkan sesuai dengan volume yang direkomendasikan ke dalam tabung reaksi berisi 50 µL sampel.
2. Jika diperlukan, tambahkan PBS+0,5% BSA+0,09% NaN<sub>3</sub> hingga volume akhir 100 µL per tabung. Lakukan homogenisasi.
3. Inkubasi selama 15 menit pada suhu ruang dalam ruang gelap.
4. Tambahkan 2mL PBS+0,5% BSA+0,09% NaN<sub>3</sub> ke dalam tabung berisi pelet sel, homogenkan.
5. Sentrifus selama 5 menit pada 540g.
6. Buang supernatan tanpa mengganggu pellet sel. Sisakan volume residu kurang lebih 50 µL pada setiap tabung.
7. Re-suspensi pelet sel dengan homogen perlahan.
8. Tambahkan 100 µL reagen fixative/Fix&Perm
9. Inkubasi selama 15 menit pada suhu ruang dalam ruang gelap.
10. Tambahkan 2mL PBS+0,5% BSA+0,09% NaN<sub>3</sub> ke dalam tabung berisi pelet sel, homogenkan.
11. Sentrifus selama 5 menit pada 540g.
12. Buang supernatan tanpa mengganggu pellet sel. Sisakan volume residu kurang lebih 50 µL pada setiap tabung.
13. Re-suspensi pelet sel dengan homogenisasi perlahan.
14. Tambahkan 100 µL reagen yang terdiri dari permeabilizing solution/Fix&perm. Homogenisasi.

15. Tambahkan antibodi intraselular sesuai dengan rekomendasi EuroFlow/pabrikan. Homogenisasi.
16. Inkubasi selama 15 menit pada suhu ruang dalam ruang gelap.
17. Tambahkan 2mL PBS+0,5% BSA+0,09% NaN<sub>3</sub> ke dalam tabung berisi pellet sel, homogenkan.
18. Sentrifus selama 5 menit pada 540g.
19. Buang supernatant tanpa mengganggu pellet sel. Sisakan volume residu kurang lebih 50  $\mu$ L pada setiap tabung.
20. Re-suspensi pellet sel dengan 200  $\mu$ L PBS+0,5% BSA+0,09% NaN<sub>3</sub>.
21. Akuisisi sel setelah pewarnaan atau jika tidak segera diakuisisi simpan pada suhu 4°C sampai 3 jam sebelum akuisisi.

# Lampiran 2. Strategi gating dan interpretasi panel 8-color 3 tube

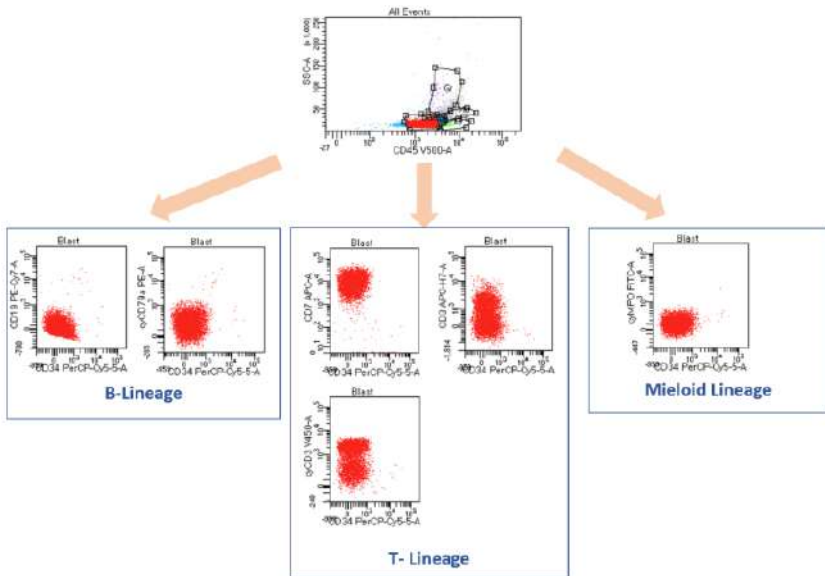
Pada setiap tahap *gating* dilakukan *gating* eksklusvi untuk menyingkirkan *doublet* serta *gating* inklusi (*cells*). *Gating* inklusi untuk memasukkan *dot plot* yang disertakan dalam analisis.



**Gambar L.1.** Dilakukan *gating singlet* untuk menyingkirkan *doublet*, selanjutnya dilakukan *gating cells* untuk inklusi data-data yang akan masuk dalam analisis (*courtesy* Laboratorium Patologi Klinik & Mikrobiologi RS Kanker Dharmais)

1. *Acute leukemia screening tube (ALOT)*

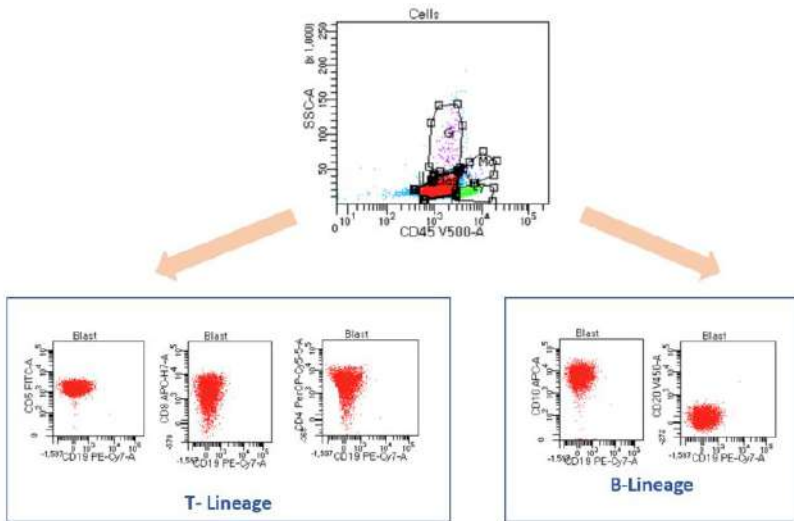
Panel ALOT bertujuan melakukan skrining awal, kemudian ditentukan panel pemeriksaan lanjutan.



**Gambar L.2.** Dilakukan *gating* pada CD 45 *dim*. Didapatkan penanda positif CD7, CD3, cyCD3 sesuai penanda limfoblas sel T, sehingga diputuskan untuk dilanjutkan pemeriksaan ALO 3 (*courtesy* Laboratorium Patologi Klinik & Mikrobiologi RS Kanker Dharmais)

2. Leukemia limfoblastik akut

Penanda limfoblas dapat dilihat pada ALO 3 (panel EuroFlow). Panel ini membedakan limfoblas sel B dan Sel T.

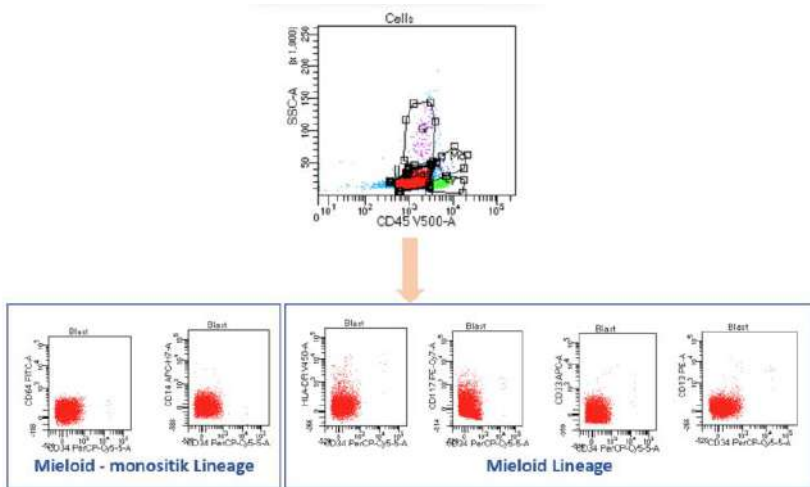


**Gambar L.3.** Dilakukan *gating* pada CD 45 *dim*. Didapatkan penanda positif CD5, CD8, CD4 sesuai penanda limfoblas sel T, namun didapatkan ekspresi aberan CD10. Pasien disimpulkan sebagai ALL sel T dengan ekspresi aberan CD10 (*courtesy* Laboratorium Patologi Klinik & Mikrobiologi RS Kanker Dharmais)



3. Leukemia mieloblastik akut

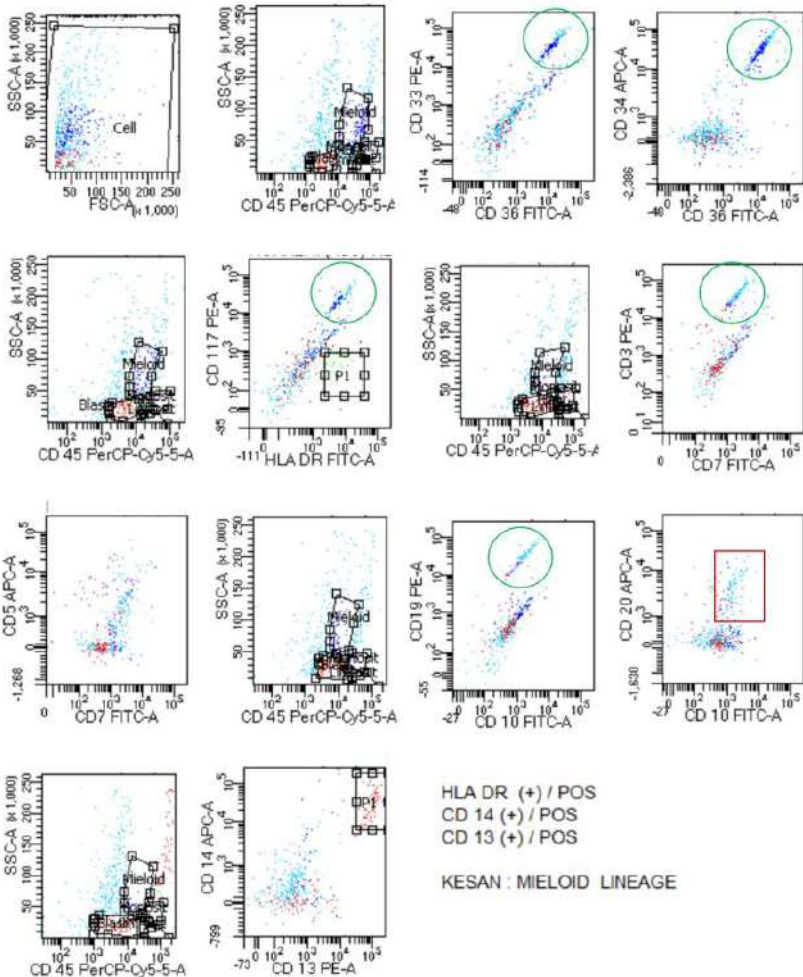
Penanda mieloblas dapat dilihat pada ALO 2 (panel EuroFlow). Panel ini menilai karakteristik galur mieloid.



**Gambar L.4.** Dilakukan *gating* pada CD 45 dim. Didapatkan semua penanda mieloid negatif (*courtesy* Laboratorium Patologi Klinik & Mikrobiologi RS Kanker Dharmais)

4. *Small sample tube*

*Small sample tube* umumnya dapat berasal dari cairan otak maupun cairan tubuh lainnya. Perlu diperhatikan bahwa umumnya volume dan jumlah sel sedikit, sehingga harus dinilai kecukupan sampel untuk dilakukan pemeriksaan. Gambar L.5 menggambarkan pemeriksaan fenotiping leukemia pada cairan otak.



**Gambar L.5.** Pasien dengan AML, menunjukkan gejala klinis lemah sesisi sehingga diduga terjadi infiltrasi AML ke susunan saraf pusat.

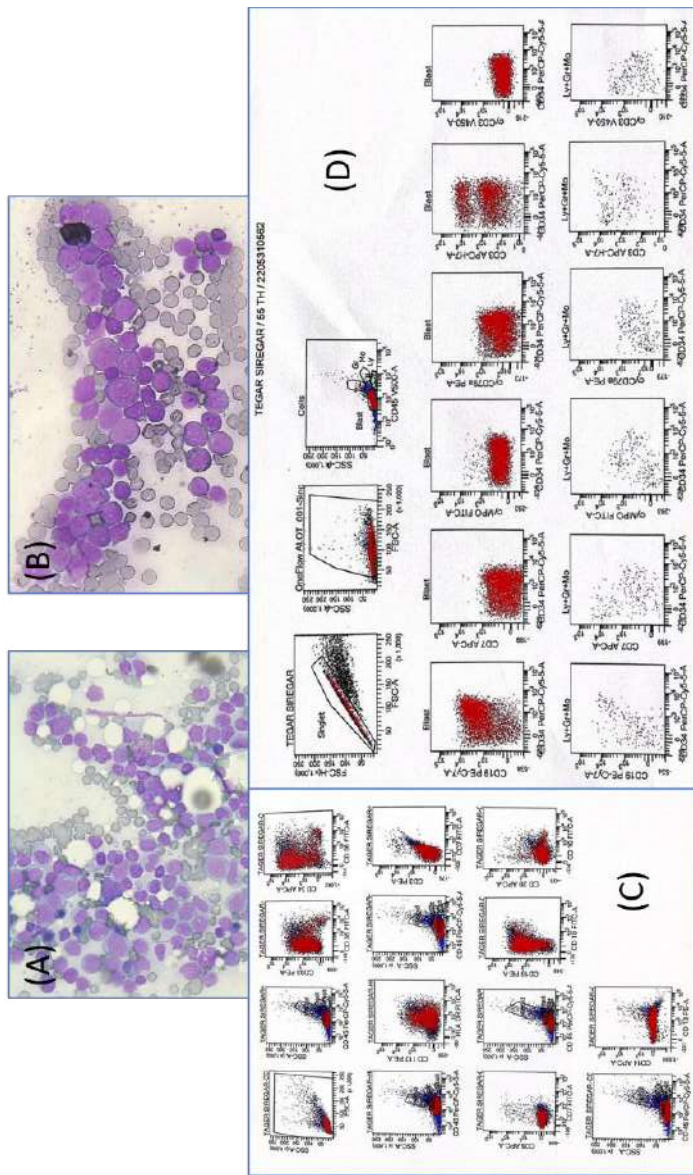
Dilakukan pemeriksaan fenotiping leukemia pada cairan otak. Dilakukan *gating* pada CD45 *dim*, didapatkan positif penanda HLA-DR, CD14, dan CD13, sesuai *lineage* mieloid. Pada grafik CD20-CD10 didapatkan populasi dicurigai sel blas (kotak merak), tetapi ketika dilakukan *gating* balik, didapatkan *unspecified binding*. Lingkaran hijau menunjukkan gambaran apabila kompensasi kurang baik, bukan suatu populasi tersendiri (*courtesy* Laboratorium Patologi Klinik & Mikrobiologi RS Kanker Dharmais)

# Lampiran 3. Formulir permintaan pemeriksaan fenotiping leukemia

FORMULIR PERMINTAAN PEMERIKSAAN KHUSUS KEGANASAN HEMATOLOGI LABORATORIUM PATOLOGI KLINIK	
<b>Data Pasien (mohon diisi LENGKAP)</b>	<b>Dokter pengirim</b>
Nama : .....	Nama : .....
Tanggal lahir/usia : ..... / ..... tahun	Alamat : .....
Jenis kelamin : L / P	Telepon/HP : .....
No. rekam medik : .....	Tanggal/pukul : ..... / .....
Ruang : .....	Tanda tangan : .....
<b>Keterangan klinik (mohon diisi LENGKAP)</b>	
Diagnosis kerja : .....	
: .....	
: .....	
: .....	
Pro : diagnosis / evaluasi terapi ( <b>lingkari salah satu</b> )	
<b>Pemeriksaan fisik</b>	<b>Pemeriksaan laboratorium</b>
Pembesaran KGB : ya / tidak	Kadar hemoglobin : ..... g/dL
Hepatomegali : ya / tidak	Hitung leukosit : ..... sel/ $\mu$ L
Splnomegali : ya / tidak	Hitung trombosit : ..... sel/ $\mu$ L
Lain-lain : .....	Kadar LDH : ..... U/L
: .....	Lain-lain : .....
: .....	: .....
: .....	: .....
<b>PEMERIKSAAN YANG DIMINTA (beri centang)</b>	
<input type="checkbox"/> <b>Gambaran sumsum tulang</b>	<input type="checkbox"/> <b>Pewarnaan SBB</b>
Jadwal : 24 Jam, 7 hari/minggu	Jadwal : 24 Jam, 7 hari/minggu
Bahan : sumsum tulang – EDTA	Bahan : <input type="checkbox"/> sumsum tulang – EDTA,
Volume : 3 mL	<input type="checkbox"/> darah tepi – EDTA
Syarat : sampai di lab <4 jam, jika ditunda, buat 10 <i>slide</i> tanpa fiksasi	Volume : 3 mL
<b>ditolak jika ada bekuan</b>	Syarat : sampai di lab <4 jam, jika ditunda, buat 5 <i>slide</i> tanpa fiksasi
	<b>ditolak jika ada bekuan</b>
<input type="checkbox"/> <b>Sitogenetika</b>	<input type="checkbox"/> <b>Immunophenotyping</b> leukemia / limfoma / BCLPD ( <b>lingkari salah satu</b> )
Jadwal : darah tepi – Senin, Selasa, Jumat	Jadwal : Senin-Jumat, khusus hari Jumat sebelum jam 12.00
Bahan : <input type="checkbox"/> sumsum tulang – heparin	Bahan : <input type="checkbox"/> sumsum tulang – EDTA,
<input type="checkbox"/> darah vena – heparin	<input type="checkbox"/> darah tepi – EDTA
Volume : 1 mL sumsum tulang + 125 $\mu$ L heparin	<input type="checkbox"/> cairan otak – antikoagulan
1 mL darah vena + 25 $\mu$ L heparin	Volume : 3 mL
Syarat : sampai di lab <6 jam, <b>ditolak jika ada bekuan atau tabung tidak tertutup rapat</b>	Syarat : sampai di lab <24 jam, <i>slide</i> 5 buah, tanpa fiksasi, suhu ruang
	<b>ditolak jika ada bekuan</b>
<input type="checkbox"/> <b>Sitologi cairan tubuh – keganasan hematologi (MGG)</b>	<input type="checkbox"/> <b>Sitologi <i>imprint</i> (MGG)</b>
Jadwal : 24 Jam, 7 hari/minggu	Jadwal : 24 Jam, 7 hari/minggu
Bahan : <input type="checkbox"/> cairan otak – antikoagulan	Bahan : <i>slide</i> tanpa fiksasi
<input type="checkbox"/> cairan .....	<input type="checkbox"/> <i>imprint</i> sumsum tulang
Volume : 3 mL	<input type="checkbox"/> <i>imprint</i> FNAB KGB
Syarat : sampai di lab <1 jam, <b>ditolak jika tidak segar</b>	<input type="checkbox"/> <i>imprint</i> .....
	Syarat : sampai di lab <24 jam, suhu ruang

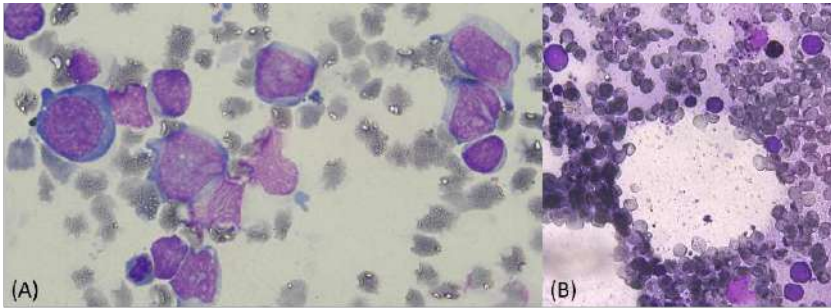
## Lampiran 4. Ilustrasi kasus

Pada tanggal 31 Mei 2022, dilakukan pemeriksaan morfologi sumsum tulang dan fenotiping leukemia pada Tn. T, usia 37 tahun dengan keterangan klinis leukemia akut pro diagnostik. Hematologi rutin pasien menunjukkan hasil bisitopenia dengan leukositosis. Hasil pembacaan sumsum tulang adalah ALL L2, didapatkan sel limfoblas 84.5%. Pemeriksaan imunofenotiping memberikan hasil B *lineage* dengan ekspresi aberan CD33, CD13, dan CD117. Hasil pemeriksaan tanggal 31 Mei dapat dilihat pada Gambar L.6.

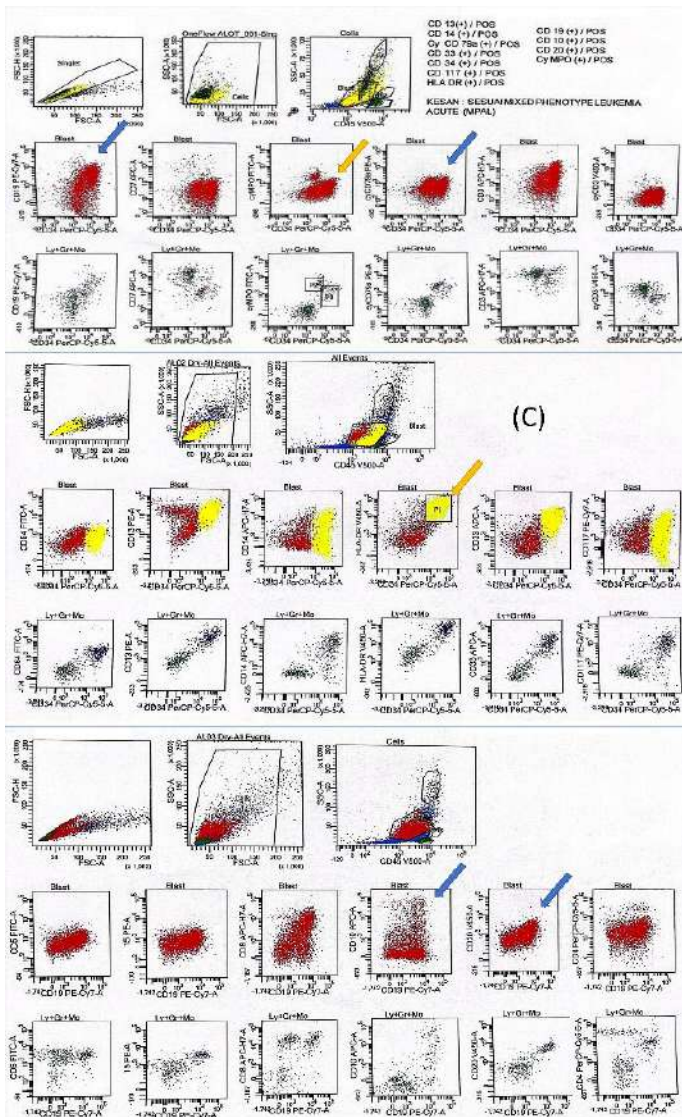


**Gambar L.6.** Hasil pemeriksaan Tn. T tanggal 31 Mei 2022. Gambar A dan B menunjukkan ditemukan banyak sel limfoblas dengan SBB negatif. Hasil pemeriksaan fenotiping leukemia 4 color, pada *gating* CD 45 *dim* didapatkan populasi positif CD33, CD34, CD117, CD19 (gambar C), sehingga dilakukan pewarnaan intrasel. Pewarnaan intrasel (Gambar D) menunjukkan positif terhadap CD19 dan cyCD79a, negatif terhadap cyMPO.

Berdasarkan hasil di atas pasien mendapatkan terapi ALL. Kemudian pada bulan September 2022 dilakukan pemeriksaan morfologi sumsum tulang dan fenotiping leukemia untuk evaluasi hasil terapi (Gambar L.7).



**Gambar L.7A & B.** Hasil pemeriksaan Tn. T tanggal 7 September 2022. Gambar menunjukkan ditemukan sel limfoblas dengan SBB positif.



**Gambar L.7C.** Hasil pemeriksaan fenotiping leukemia 8 warna (panel ALOT) menunjukkan populasi CD 45 *dim* positif terhadap CD34, CD19, cyMPO, cyCD79a sehingga dilanjutkan pemeriksaan ALO2 dan ALO 3 di mana populasi CD45 *dim* positif terhadap CD34, CD13, CD14, HLA-DR, CD33, CD117, dan CD10, CD20. Pasien didiagnosis sebagai MPAL