



# BUKU RUMPUN PATOLOGI KLINIK

ENHANCE THE ROLE OF LABORATORY MEDICINE IN EVIDENCE-BASE  
PLANNING AND DECISION MAKING TO SUPPORT HEALTH  
TRANSFORMATION IN INDONESIA

 [pdspatklinpekanbaru](#)  
 [Pds Patklin Pekanbaru](#)



# BUKU RUMPUN PATOLOGI KLINIK

*Enhance the Role of Laboratory Medicine in Evidence- Based  
Planning and Decision Making to Support Health Transformation  
in Indonesia*



Diterbitkan Oleh:

Perhimpunan Dokter Spesialis Patologi Klinik dan Kedokteran Laboratorium

Jl Lontar no 5 Menteng Atas, Sahardjo, Jakarta Selatan, 12960

Indonesia, Tahun 2023

# **BUKU RUMPUN PATOLOGI KLINIK**

*Enhance the Role of Laboratory Medicine in Evidence- Based Planning and Decision Making to Support Health Transformation in Indonesia*

Redaksi :

Bidang Ilmiah

PDS PatKlin Pekanbaru

Penerbit

Perhimpunan Dokter Spesialis Patologi Klinik dan Kedokteran Laboratorium Indonesia

Jl Lontar no 5 Menteng Atas, Sahardjo, Jakarta Selatan, 12960

## **DISAIN SAMPUL DAN TATA LETAK**

Dr. Verbrini Rifnayeni, Sp.PK

Dr. Wiwit Nila Sukma, Sp.PK

Dr. Agung Panji Widiyanto, M.Med.Sc., Sp.PK

Cetak Pertama, Oktober 2023

## **Hak Cipta dilindungi undang-undang :**

Dilarang memperbanyak, mencetak, dan menerbitkan sebagian atau seluruh karya tulis buku ini dalam bentuk dan dengan cara apapun tanpa izin tertulis dari penulis dan penerbit.

# **BUKU RUMPUN PATOLOGI KLINIK**

*Enhance the Role of Laboratory Medicine in Evidence- Based Planning  
and Decision Making to Support Health Transformation in Indonesia*

## **KONTRIBUTOR**

DR.dr. Sianny H, M.Kes., SpPK(K)

DR. Dr. Zelly Dia Rofinda, Sp.PK(K)

Dr. Yulia Nadar Indrasari, Sp.PK

DR. Dr. Delita Prihatni, Sp.PK(K), M.Kes.

Dr. Basti Andriyoko, Sp.PK

DR. Dr. Merci Monica Pasaribu, Sp.PK(K)

Dr. Yekti Hediningsih, MSi.Med, Sp.PK

DR. Dr. Asvin Nurulita, M.Kes., Sp.PK(K)

Dr. Maria Immakulata Diah Pramudianti, M.Sc., Sp.PK(K)

Dr. Fridayenti, Sp.PK(K)

Dr. Maimun Zulhaidah Arthamin, M.Kes., Sp.PK(K)

DR. Dr. Nyoman Suci Widyastiti, M.Kes., Sp.PK(K)



## **KATA PENGANTAR KETUA PENGURUS PUSAT PDS PatKLIn**

Assalamu'alaikum Wr.Wb. Shalom. Om Swastyastu. Namu Buddhaya. Salam kebajikan. Salam sejahtera bagi kita semua.,

Pengurus Pusat PDS PatKLIn dengan bangga menyambut penerbitan buku Rumpun Patologi Klinik dengan tema “*Enhance the Role of Laboratory Medicine in Evidence-based Planning and Decision Making to Support Health Transformation in Indonesia*”. Tema ini terasa penting dimaknai dalam bidang pelayanan kesehatan dewasa ini, mengingat transformasi digital merupakan suatu tantangan yang harus dihadapi oleh tenaga medis. Proses digitalisasi yang baik dan sesuai dengan fungsi serta norma pelayanan kesehatan merupakan target setiap pelayanan kesehatan, termasuk dunia kedokteran laboratorium. Keberadaan teknologi digital tentunya akan meningkatkan kualitas pelayanan laboratorium baik dalam hal efisiensi dan efektivitas, serta kualitas pelayanan itu sendiri.

Besar harapan bahwa buku ini dapat menjadi membantu proses pembaharuan keilmuan dan pengetahuan baik dalam hal teknis maupun peraturan yang berlaku saat ini, serta menjadi suatu sarana untuk pertukaran pengalaman yang terutama berkaitan dengan kedokteran laboratorium. Seyogyanya hal-hal ini dapat menjadi bekal dalam menjalankan profesi dan meningkatkan mutu pelayanan bagi sejawat di tempat bertugasnya masing-masing. Terima kasih kepada segenap panitia pengarah dan pelaksana serta mitra kerja yang telah menyumbangkan tenaga, waktu dan pemikiran dalam proses persiapan kegiatan ini. Semoga buku ini dapat memenuhi fungsinya dan membawa kebaikan bagi para pembacanya.

Om Santih Santih Santih Om, Wassalamualaikum wr.wb...

**Agustus 2023,**

**Ketua PP PDS PatKLIn,**

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

## KATA PENGANTAR KETUA PANITIA

Puji dan Syukur kita panjatkan ke hadirat Tuhan Yang Maha Esa atas segala Rahmat dan hidayah-Nya sehingga Buku Rumpun Patologi Klinik “*Enhance the Role of Laboratory Medicine in Evidence-Based Planning and Decision Making to Support Health Transformation in Indonesia*” dapat diterbitkan. Saat ini pemerintah sedang melaksanakan transformasi besar-besaran di bidang kesehatan dan kita sebagai praktisi laboratorium harus ikut serta dalam program tersebut, salah satunya dengan meningkatkan ilmu pengetahuan dan keterampilan dokter spesialis patologi klinik sehingga peran dokter spesialis patologi klinik dalam transformasi kesehatan dapat lebih ditingkatkan.

Saya selaku ketua PDS PatKLIn Cabang Pekanbaru periode 2022-2025 mengucapkan terima kasih kepada penulis, pengurus dan anggota PDS PatKLIn Pekanbaru atas dukungan dan jerih payahnya sehingga buku ini bisa diterbitkan.

Buku ini memuat berbagai materi tentang berbagai pemeriksaan laboratorium terkini sehingga bisa dimanfaatkan baik di fasilitas layanan kesehatan atau di pusat pendidikan. Buku ini diharapkan dapat menjadi salah satu sumber referensi bagi dokter spesialis patologi klinik dan tenaga kesehatan lain yang berkecimpung di bidang laboratorium dalam melaksanakan praktek laboratorium sehari-hari.

Semoga buku rumpun patologi klinik ini dapat berfungsi sebagaimana yang diharapkan. Tentunya buku ini jauh dari sempurna, karena itu segala kritik dan saran demi penyempurnaan buku ini sangat kami harapkan.

Pekanbaru, Oktober 2023

**Dr.dr. Fatmawati, SpPK (K)**

## DAFTAR ISI

<b>Kata Pengantar Ketua Pengurus Pusat PDS PatKLin</b> .....	vi
<b>Kata Pengantar Ketua Panitia</b> .....	vii
<b>Daftar Isi</b> .....	viii
<b>Bab 1 Antiglobulin Test In Clinical Practice</b> .....	1
<i>1.1. Overview Of Direct And Indirect Antiglobulin Test</i> .....	1
<i>1.2. Case Study Of Antiglobulin Test</i> .....	17
<b>Bab 2 PRP Treatment And Fibrin Glue</b> .....	27
<i>2.1. Clinical Application And Legal Issue Of PRP (Platelet-Rich Plasma), PRF (Platelet-Rich Fibrin) Treatment, And Fibrin Glue</i> .....	27
2.2 Prosedur Pembuatan Berbagai Bahan Otologus.....	38
<b>Bab 3 Molecular Laboratory Set Up</b> .....	45
3.1. Managemen Biorisiko .....	45
3.2. Molecular Laboratory Design .....	53
3.3. <i>Next-Generation Sequencing (NGS)</i> .....	58
<b>Bab 4 Optimizing Digital Platform In Verification And Validation Laboratory Result</b> .....	64
<i>4.1. Digital Platform In Laboratory Service And Its Application In Verification And Validation</i> .....	64
<i>4.2. Logical Observation Identifiers Name And Codes (LOINC)</i> .....	71
<b>Bab 5 Evaluation Blood Smear And Bone Marrow Aspiration</b> .....	75
5.1. Prosedur Aspirasi Sumsum Tulang Dan Pembuatan Preparat .....	75
5.2. Evaluasi Sediaan Apusan Darah Tepi Dan Sumsum Tulang Fokus Pada Morfologi Dan Identifikasi Sebagai Penunjang Diagnosis .....	106
5.3. Reporting Of Blood Smear And Bone Marrow Aspiration.....	128







# BAB 1

## ANTIGLOBULIN TEST IN CLINICAL PRACTICE

### 1.1. OVERVIEW OF DIRECT AND INDIRECT ANTIGLOBULIN TEST

Sianny Herawati

Departemen Patologi Klinis Fakultas Kedokteran Universitas Udayana / RSUP Prof. Dr.  
I.G.N.G Ngoerah Denpasar

## I. PENDAHULUAN

*Antiglobulin test* atau *Antihuman globulin test* atau *Coombs' test* merupakan pemeriksaan untuk mengetahui adanya antibodi atau komplemen yang terikat pada permukaan eritrosit maupun yang bersirkulasi dalam plasma/serum pasien dengan menggunakan reagen *Anti Human Globulin (AHG)* untuk membentuk reaksi aglutinasi yang visibel. *Antiglobulin test* didasarkan pada prinsip bahwa AHG yang diperoleh dari *immunized nonhuman species* berikatan dengan *human globulin* seperti IgG atau komplemen baik dalam bentuk bebas di dalam serum atau berikatan dengan antigen eritrosit (Green *et al.*, 2019; Parker & Tormey, 2017).

Sebelum dikembangkan *antiglobulin test*, hanya antibodi IgM saja yang dapat terdeteksi melalui pemeriksaan langsung, kemudian dengan ditemukannya *antiglobulin test* mampu mendeteksi *non agglutinating IgG antibodies* dan sebagai langkah awal ditemukannya berbagai karakteristik sistem golongan darah. Tahun 1945, Coombs, Mourant dan Race menjelaskan penggunaan *antiglobulin test* untuk mendeteksi antibodi lemah dan *non agglutinating Rh antibodies* di dalam serum. Tahun 1946, Coombs dkk menjelaskan penggunaan *antiglobulin test* utk mendeteksi sensitisasi *in vivo* pada eritrosit neonatus yang mengalami *Hemolytic Disease of The Fetus and Newborn (HDFN)*. Awalnya pemeriksaan ini dikenal sebagai *Coombs' test*, namun kemudian dikenal sebagai *Direct Antiglobulin Test (DAT)* (Green *et al.*, 2019; Nayak, 2020).

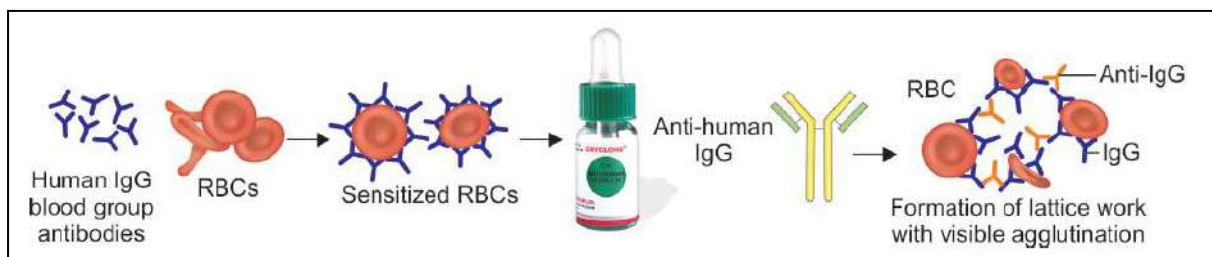
## II. ANTIGLOBULIN TEST

### 2.1. PRINSIP ANTIGLOBULIN TEST

- Ketika IgG (gamma globulin) dan komplemen (beta globulin) yang berasal dari manusia diinjeksikan ke hewan (kelinci), maka akan merangsang produksi antibodi IgG terhadap globulin tersebut yang

kemudian diproses dan diproduksi sebagai reagen *Coombs* / reagen AHG spektrum luas.

- Eritrosit yang dilapisi antibodi inkomplit IgG atau komplemen C3 tidak dapat langsung menghasilkan aglutinasi eritrosit (hemaglutinasi) meskipun setelah dilakukan sentrifugasi atau penambahan teknik atau media penguat seperti *Polyethelene glycol (PEG)*, *Low-Ionic Strength Solution (LISS)*, albumin atau enzim.
- Reaksi oleh antibodi ini dapat divisualisasikan dengan menggunakan reagen AHG yang berperan sebagai jembatan yang menghubungkan antibodi inkomplit IgG atau komplemen baik yang melekat pada eritrosit atau bebas di dalam serum, sehingga menimbulkan aglutinasi, yang diinterpretasi sebagai *Coombs test* positif (Jaime-Pérez & Almaguer-Gaona, 2016; Nayak, 2020).



**Gambar 1. Prinsip Antiglobulin Test** (Nayak, 2020)

Terdapat dua jenis *antiglobulin test* yaitu *Direct Antiglobulin Test (DAT)* dan *Indirect Antiglobulin Test (IAT)*.

## 2.2. DIRECT ANTIGLOBULIN TEST (DAT)

*Direct Antiglobulin Test* merupakan pemeriksaan sederhana untuk mendeteksi sensitisasi eritrosit *in vivo* oleh IgG, komplemen atau keduanya. Pada individu sehat terdapat 5 – 90 IgG / eritrosit dan 5 – 40 C3d / eritrosit. Tergantung pada teknik dan reagen yang digunakan, DAT dapat mendeteksi 100 – 500 IgG / eritrosit dan 400 – 1.100 C3d / eritrosit. (Leger, 2011; Novotny, 2019).

Beberapa hal yang dapat menyebabkan hasil DAT positif yaitu:

1. *Hemolytic Disease of The Fetus and Newborn (HDFN)*, terdapat aloantibodi maternal yang melapisi eritrosit fetus

2. *Acute or Delayed Hemolytic Transfusion Reaction (HTR)*, terdapat aloantibodi terhadap antigen eritrosit positif yang baru ditransfusikan
3. *Autoimmune Hemolytic Anemia /AIHA (Warm Autoimmune hemolytic anemia/WAIHA atau Cold Agglutinin Disease)*
4. *Drug-induced hemolytic anemia (drug dependent antibodies atau drug independent antibodies)*
5. Aloantibodi didapat secara pasif (misal plasma donor, *derivatives*, imunoglobulin)
6. *Adsorbed protein non spesifik* (misal hipergamaglobulinemia, *immune globulin intravena dosis tinggi*, modifikasi membran eritrosit oleh beberapa obat)
7. Aktivasi komplemen akibat infeksi bakteri, autoantibodi atau aloantibodi
8. Antibodi yang diproduksi oleh *passanger lymphocytes* (misal transplantasi organ atau komponen hematopoietik)
9. Peningkatan IgG atau komplemen pada *sickle cell disease*, *β-thalassemia*, penyakit ginjal, *multiple myeloma*, kelainan autoimun, AIDS dan penyakit lain yang berhubungan dengan peningkatan kadar globulin serum dan *Blood Urea Nitrogen (BUN)* (Green *et al.*, 2019; Leger, 2011; Novotny, 2019).

*Direct Antiglobulin Test* dapat pula menjadi positif pada individu yang sehat. *Direct Antiglobulin Test* positif dilaporkan terjadi pada 1:1.000 hingga 1:14.000 donor sehat, dan 1:6 hingga 1:100 pasien yang dirawat di rumah sakit tanpa tanda-tanda hemolisis atau anemia hemolitik. Interpretasi hasil DAT positif harus mempertimbangkan riwayat pasien, data klinis, informasi ada tidaknya anemia hemolitik, riwayat pengobatan, kehamilan, transfusi dan hasil pemeriksaan laboratorium lainnya (Leger, 2011; Novotny, 2019).

**Tabel 1. Hasil DAT pada beberapa tipe anemia hemolitik** (Parker & Tormey, 2017).

Kelainan	Hasil DAT	Kelas imunoglobulin	Spesifitas antibodi
<b>Anemia hemolitik autoimun</b>			
WAIHA	IgG, C3 atau keduanya	IgG	Bervariasi, lebih sering Rh
CAS ( <i>Cold agglutinin syndrome</i> )	C3	IgM	Anti-I atau i
Mixed-type	IgG + C3	IgG <i>warm</i> + IgM <i>cold</i>	Sesuai dengan WAIHA dan CAS
PCH ( <i>Paroxysmal Cold Hemoglobinuria</i> )	C3	IgG	Anti-P
<b>Drug-induced immune hemolytic anemia</b>			
<i>Drug-dependent antibody</i>	IgG, C3 atau keduanya	IgG, IgM atau keduanya	Bervariasi
<i>Drug-independent antibody</i>	IgG ± C3	IgG	Bervariasi
<b>Anemia hemolitik aloimun</b>			
Reaksi transfusi	IgG ± C3	IgG, IgM atau keduanya	Bervariasi
HDFN	IgG	IgG	Biasanya anti-D, anti-K dan anti-c

Sampel yang direkomendasikan untuk pemeriksaan DAT adalah darah segar (kurang dari 24 jam) dan sampel darah EDTA, dimana EDTA mencegah aktivasi komplemen *in vitro* dengan mengikat kalsium yang diperlukan untuk aktivasi C1, sehingga yang terdeteksi pada pemeriksaan hanya komplemen yang melekat pada permukaan eritrosit *in vivo*. Bila hasil DAT positif komplemen, menggunakan sampel darah simpan beku, maka pemeriksaan harus dikonfirmasi dengan sampel darah segar yang diinkubasi pada suhu 37°C atau menggunakan sampel darah EDTA untuk kepentingan diagnostik (Leger, 2011).

Pemeriksaan DAT dilakukan dengan meneteskan satu tetes suspensi eritrosit yang sudah dicuci (3% - 5%), dan reagen polispesifik (anti-IgG, anti-C3d). Hasil positif dilanjutkan dengan panel monospesifik untuk menentukan tipe protein yang mensensitisasi eritrosit. Pemeriksaan DAT tidak memerlukan inkubasi karena kompleks antigen-antibodi sudah terbentuk *in vivo* (Green *et al.*, 2019).

Tujuan pencucian eritrosit adalah untuk menghilangkan globulin dan komplemen yang ada di dalam plasma, yang dapat menetralsasi reagen AHG sehingga menimbulkan hasil negatif palsu. Eritrosit harus segera dilakukan pemeriksaan setelah pencucian untuk

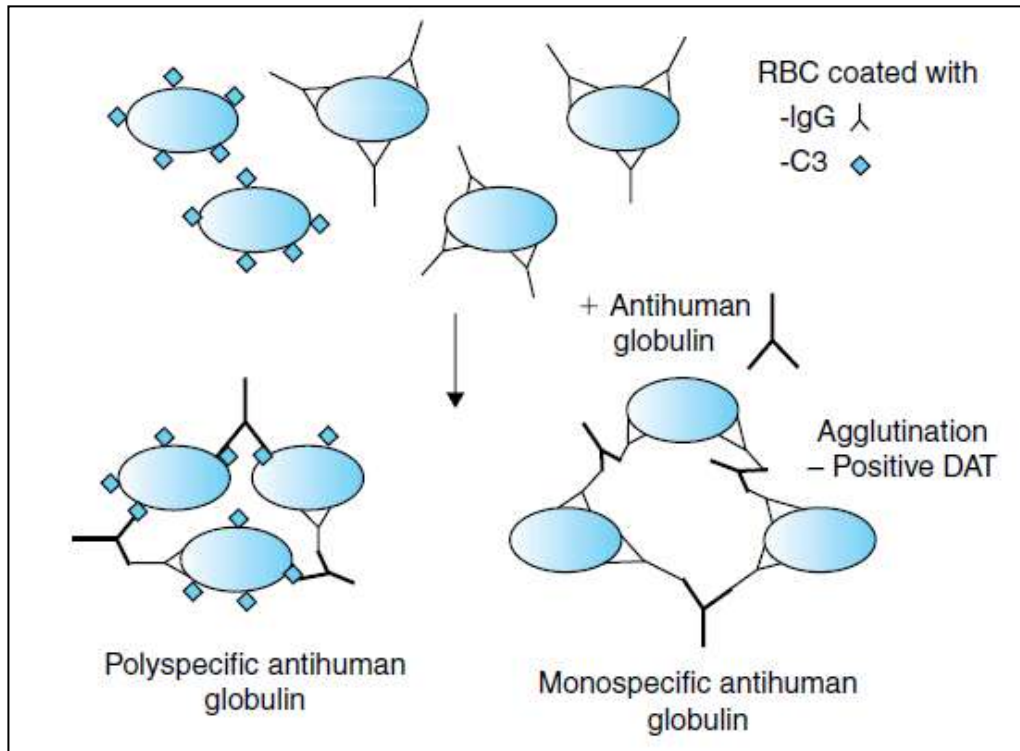


mencegah hasil negatif palsu akibat terjadinya elusi dari IgG. Keterlambatan pembacaan hasil juga dapat menyebabkan hasil negatif palsu atau hasil yang lemah. Beberapa reagen antikomplemen juga dapat memberikan reaktivitas lebih kuat bila terjadi keterlambatan sentrifugasi setelah ditambahkan reagen tersebut (Leger, 2011).

**Tabel 2. Penyebab hasil DAT positif palsu dan negatif palsu (Parker & Tormey, 2017)**

Hasil DAT positif palsu	Hasil DAT negatif palsu
<i>Refrigerated clotted specimen</i> yang menyebabkan ikatan komplemen secara <i>in vitro</i>	Hemolisis berat
Kadar imunoglobulin serum yang tinggi atau adanya protein / <i>rouleaux</i>	Hemolisis yang dimediasi oleh IgA atau IgM
Pemberian <i>Intravenous Immune Globulin (IVIg)</i>	IgG yang melekat pada eritrosit di bawah limit deteksi DAT
<i>Antiphospholipid syndrome</i>	Antibodi dengan afinitas rendah
Infeksi, HIV, malaria	Teknik pemeriksaan kurang tepat atau <i>technical error</i>
<i>Wharton jelly</i> (pada kehamilan atau pemeriksaan darah tali pusat)	
Teknik pemeriksaan kurang tepat atau <i>technical error</i>	

Ketika hasil DAT positif dengan anti-IgG dan anti-C3, maka dilakukan pula pemeriksaan dengan reagen kontrol (misal albumin 6% atau saline). Bila tidak terjadi aglutinasi eritrosit dengan reagen kontrol, dapat menjamin hasil pemeriksaan yang telah dilakukan akurat. Namun bila hasil kontrol reaktif, maka hasil DAT tersebut *invalid*. Reaktivitas dengan reagen kontrol juga mengindikasikan adanya aglutinasi spontan yang dapat disebabkan oleh *coating* IgG yang kuat, *warm-reactive* IgG yang jarang, atau *IgM cold autoagglutinin* yang tidak mengalami disosiasi selama pencucian (Leger, 2011).



**Gambar 2. Direct Antiglobulin Test (DAT)** (Novotny, 2019)

Prosedur pemeriksaan DAT metode tabung:

1. Siapkan suspensi eritrosit 3 -5% (dalam saline)
2. Lakukan pencucian eritrosit 3 – 4 kali menggunakan saline fisiologis untuk menghilangkan protein yang tidak terikat dan buang sebanyak mungkin saline pasca pencucian terakhir.
3. Tambahkan satu tetes suspensi sel ke dalam tabung bersih yang telah diberi label, kemudian tambahkan 2 tetes reagen AHG polispesifik, kemudian campur dan sentrifugasi 1.000 rpm selama 1 menit
4. Goyangkan tabung dan perhatikan ada tidaknya aglutinasi. Jika hasil pemeriksaan negatif, tambahkan satu tetes *coombs' control cells*.
5. Campur dan sentrifugasi 1.000 rpm selama 1 menit.
6. Perhatikan adanya aglutinasi
7. Jika tidak tampak aglutinasi, hasil pemeriksaan dinyatakan invalid dan harus dilakukan pengulangan pemeriksaan (Mulyantari & Yasa, 2016; Nayak, 2020).

### 2.3. **INDIRECT ANTIGLOBULIN TEST (IAT)**

*Indirect Antiglobulin Test* mendeteksi adanya antibodi inkomplit IgG dan / atau komplemen di dalam serum pasien. *Indirect Antiglobulin Test* dilakukan dengan sensitisasi eritrosit *in vitro*, yang digunakan pada kondisi sbb:

1. Deteksi antibodi inkomplit (*nonagglutinating*) terhadap eritrosit donor (*compatibility testing*) atau terhadap *screening cells* (skrining antibodi) pada serum
2. Identifikasi antibodi
3. Penentuan fenotip eritrosit menggunakan antisera yang diketahui (misal *weak D*, pemeriksaan antigen lain yang memerlukan IAT)
4. Titrasi antibodi inkomplit (misal titer antibodi Rhesus) (Green *et al.*, 2019; Nayak, 2020).

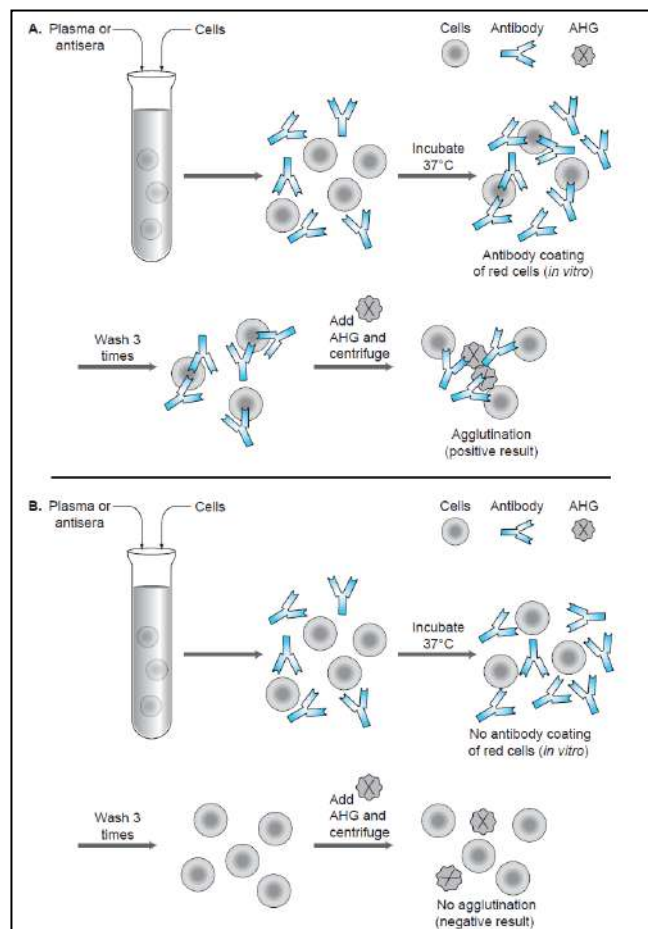
Pemeriksaan IAT dilakukan dengan prosedur dua langkah yaitu

1. Langkah inkubasi pertama: plasma pasien diinkubasi pada suhu 37°C dengan reagen sel eritrosit (sel golongan O Rhesus positif), sehingga antibodi IgG dalam plasma pasien melekat dengan antigen spesifik pada reagen sel eritrosit. Kemudian suspensi eritrosit dicuci dengan saline untuk menghilangkan antibodi yang tidak terikat atau protein komplemen
2. Langkah kedua: setelah pencucian, dilakukan penambahan reagen AHG dan sentrifugasi. Jika terjadi aglutinasi, diinterpretasikan sebagai IAT positif yang mengindikasikan adanya reaksi spesifik antara antibodi dalam serum pasien dengan antigen pada reagen eritrosit. Jika tidak terjadi aglutinasi, diinterpretasikan sebagai IAT negatif (Nayak, 2020).

Prosedur pemeriksaan IAT metode tabung:

1. Tambahkan dua tetes serum pasien ke dalam tabung yang bersih dan berikan label. (Sampel serum harus segar untuk mendeteksi antibodi yang mengikat komplemen)
2. Tambahkan satu tetes reagen suspensi sel O Rhesus positif 2-4% ke dalam tabung.
3. Inkubasi pada suhu 37°C selama 15 hingga 60 menit.
4. Amati adanya hemolisis atau aglutinasi. Aglutinasi atau hemolisis pada tahap ini menunjukkan adanya antibodi yang bereaksi terhadap saline.

5. Jika tidak terlihat hemolisis atau aglutinasi, lakukan pencucian tiga hingga empat kali dengan saline untuk menghilangkan kelebihan antibodi bebas (pencucian eritrosit yang tidak adekuat, dapat memberikan hasil negatif palsu). Buang sebanyak mungkin saline pasca pencucian terakhir.
6. Tambahkan dua tetes reagen AHG polispesifik atau monospesifik ke dalam sel yang telah dicuci di setiap tabung uji. Campur dan inkubasi pada suhu 37°C selama 10 menit.
7. Sentrifugasi pada 1.000 rpm selama 1 menit.
8. Goyangkan tabung dan periksa adanya aglutinasi, catat hasilnya.
9. Jika hasil tes negatif, tambahkan satu tetes *coombs' control cells*.
10. Campur dan sentrifugasi pada 1.000 rpm selama 1 menit.
11. Perhatikan adanya aglutinasi. Jika tidak terlihat aglutinasi, tes dianggap tidak valid dan seluruh prosedur tes harus diulang
12. Selalu sertakan autokontrol pada pemeriksaan ICT (Mulyantari & Yasa, 2016; Nayak, 2020).

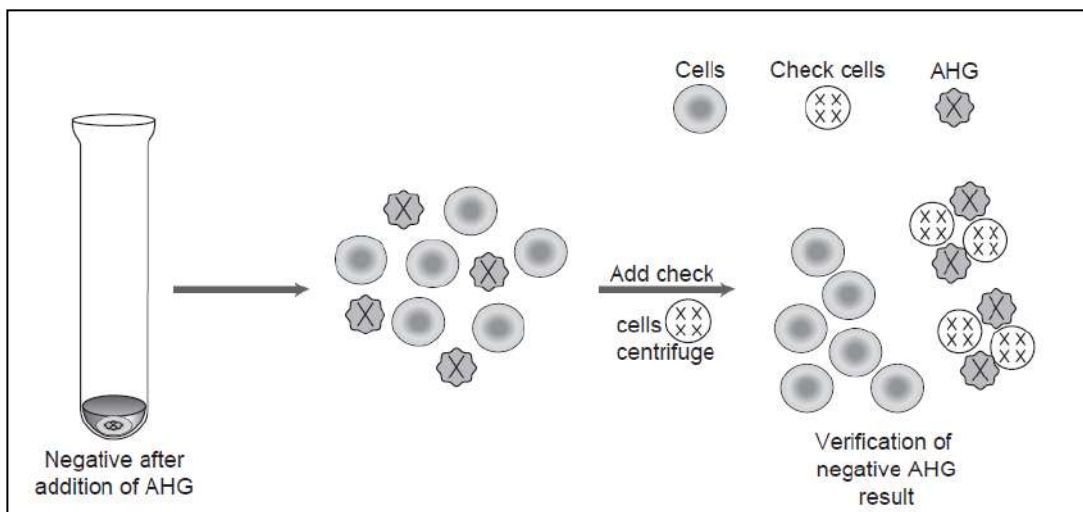


**Gambar 3. Indirect Antiglobulin Test (IAT)** (Whitlock, 2010)

**Tabel 3. Langkah-langkah dan tujuan pada pemeriksaan IAT (Green *et al.*, 2019)**

Langkah Pemeriksaan	Tujuan
Inkubasi eritrosit dengan antisera	Memberikan kesempatan agar molekul antibodi yang ada pada serum pasien melekat dengan antigen eritrosit
Melakukan pencucian saline minimal 3 kali	Menghilangkan molekul globulin bebas
Penambahan reagen AHG	Membentuk aglutinat eritrosit (Antigen eritrosit + Antibodi + anti- IgG)
Sentrifugasi	Mempercepat aglutinasi dengan mendekatkan sel satu dengan sel lainnya.
Pemeriksaan aglutinasi	Interpretasi sebagai hasil positif atau negatif
Derajat reaksi aglutinasi	Menentukan kuat lemahnya reaksi yang terjadi
Penambahan <i>Coombs' Control Cells</i> / <i>Check cells</i> pada reaksi negatif	Untuk memastikan bahwa hasil yang negatif bukan disebabkan oleh netralisasi reagen AHG oleh molekul globulin bebas ( <i>Coombs' Control Cells</i> adalah eritrosit Rhesus D positif yang dilapisi dengan anti-D)

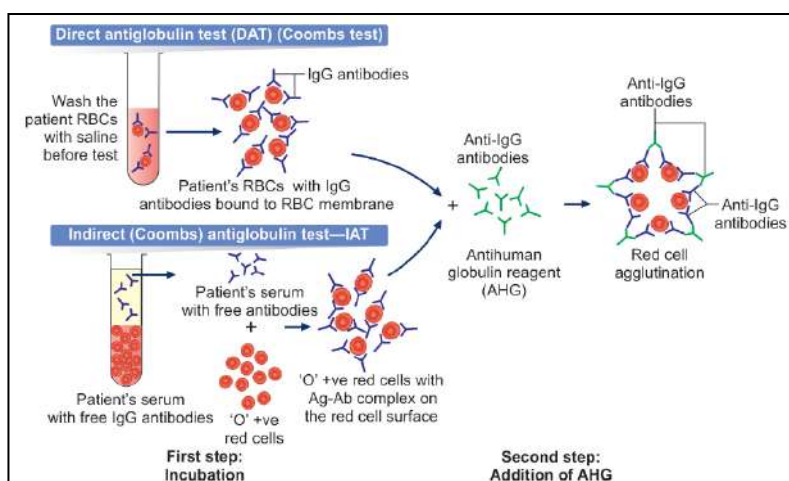
*Coombs' Control Cells* adalah eritrosit Rhesus D positif yang dilapisi oleh IgG. Sistem kontrol diperlukan pada hasil *antiglobulin test* negatif, untuk mencegah kemungkinan hasil yang negatif palsu. Bila hasil *antiglobulin test* negatif, maka penambahan *coombs' control cells* akan menyebabkan ikatan dengan reagen AHG sehingga terjadi aglutinasi. Sehingga interpretasi hasil *antiglobulin test* negatif harus didukung oleh adanya aglutinasi setelah penambahan *coombs' control cells*. Jika tidak terjadi aglutinasi, terdapat beberapa kemungkinan penyebab yaitu pencucian sel tidak adekuat, penambahan reagen AHG atau *coombs' control cells* tidak dilakukan, reagen AHG yang kurang poten, reagen AHG atau saline terkontaminasi (Nayak, 2020; Whitlock, 2010).



**Gambar 4. Konfirmasi hasil negatif dengan *coombs' control cells* (Whitlock, 2010)**

**Tabel 4. Perbedaan DAT dan IAT (Howard, 2021; Nayak, 2020)**

	DAT	IAT
Aplikasi	Untuk mengetahui HTR, HDFN, AIHA dan <i>drug induced hemolysis</i>	Untuk skrining antibodi, identifikasi antibodi, <i>crossmatch</i> , <i>red cell antigen typing</i>
Sampel	Eritrosit pasien	Plasma/serum
Sensitisasi	<i>in vivo</i> (perlekatan IgG pada eritrosit terjadi dalam tubuh pasien)	<i>in vitro</i> (perlekatan IgG pada eritrosit terjadi saat langkah inkubasi)
Prosedur	<i>one stage procedure</i>	<i>two stage procedure</i>
Inkubasi	Tidak diperlukan	memerlukan inkubasi sebelum penambahan AHG



**Gambar 5. DAT dan IAT (Nayak, 2020)**

### III. FAKTOR YANG MEMPENGARUHI HASIL ANTIGLOBULIN TEST

*Direct antiglobulin test* mampu mendeteksi 100 – 500 molekul IgG per eritrosit dan 400 – 1.100 molekul C3d per eritrosit. Untuk IAT reaksi positif bila terdapat 100 – 200 IgG atau C3 pada sel. Jumlah molekul IgG yang mensensitisasi eritrosit dan kecepatan sensitisasi dipengaruhi beberapa faktor, yaitu:

1. Rasio serum terhadap sel

Peningkatan rasio serum terhadap sel meningkatkan sensitivitas pemeriksaan. Secara umum, rasio minimum dapat diperoleh dengan menggunakan 2 tetes serum dan 1 tetes suspensi sel 5%. Bila menggunakan sel yang tersuspensi di dalam saline, keuntungannya meningkatkan rasio serum dengan sel dalam mendeteksi antibodi lemah (misal 4 tetes serum dengan 1 tetes suspensi sel 3% akan memberikan rasio 133 : 1) (Green *et al.*, 2019; Mehdi, 2013).

2. Media reaksi



Media reaksi termasuk albumin, LISS dan PEG. Albumin membantu untuk mendekatkan jarak antar sel yang terlapisi antibodi sehingga terjadi aglutinasi. *Low Ionic Strength Solutions* memperkuat pengambilan antibodi dan menurunkan waktu inkubasi dari 30 – 60 menit menjadi 10 – 15 menit dengan mengurangi potensial zeta di sekitar eritrosit. *Polyethylene glycol* adalah polimer larut air yang digunakan sebagai bahan aditif untuk meningkatkan pengambilan antibodi. Cara kerjanya dengan menghilangkan molekul air di sekitar eritrosit (teori *water of hydration*) sehingga secara efektif mengkonsentrasikan antibodi (Green *et al.*, 2019).

### 3. Suhu

Reaksi optimal kebanyakan antibodi IgG dan aktivasi komplemen adalah pada suhu 37°C. (Green *et al.*, 2019).

### 4. Waktu inkubasi

Waktu inkubasi sel tersuspensi di dalam saline, bervariasi antara 30 – 120 menit. Kebanyakan antibodi bermakna klinis dapat terdeteksi setelah inkubasi 30 menit dan pemanjangan waktu inkubasi biasanya tidak diperlukan. Jika menggunakan LISS atau PEG, waktu inkubasi dapat diperpendek menjadi 10 – 15 menit. Pemanjangan waktu inkubasi (misal sampai 40 menit) pada teknik LISS dapat menyebabkan antibodi mengalami elusi dari eritrosit dan menurunkan sensitivitas pemeriksaan (Green *et al.*, 2019).

### 5. Pencucian eritrosit

Pada pemeriksaan DAT maupun IAT, eritrosit harus dicuci dengan saline minimal 3 kali sebelum penambahan reagen AHG. Pencucian eritrosit untuk menghilangkan globulin bebas pada serum. Pencucian yang tidak adekuat dapat menyebabkan reaksi negatif palsu karena netralisasi reagen AHG oleh sisa globulin bebas dalam serum., sehingga fase pencucian merupakan langkah penting pada pemeriksaan DAT dan IAT. Kontrol fase pencucian dapat menggunakan *check cells* yaitu sel O yang disensitisasi dengan IgG. Pencucian harus dilakukan segera setelah dikeluarkan dari inkubator dan secepat mungkin untuk meminimalkan elusi antibodi afinitas rendah. Endapan sel harus diresuspensi lengkap sebelum penambahan saline untuk pencucian berikutnya. Seluruh saline harus dibuang setelah pencucian akhir karena sisa saline akan mengencerkan reagen AHG sehingga dapat menurunkan sensitivitas pemeriksaan.

Sentrifugasi pada setiap pencucian harus dilakukan dengan tepat untuk memberikan endapan sel yang stabil sehingga meminimalisasi kemungkinan hilangnya sel saat pembuangan saline (Green *et al.*, 2019).

6. Saline untuk pencucian.

Saline yang digunakan untuk pencucian harus baru (disarankan masa kadaluarsa 30 hari setelah dibuka) dan pada pH 7,2 – 7,4. Saline yang disimpan dalam waktu lama pada kontainer plastik dapat menurunkan pH, yang meningkatkan kecepatan elusi antibodi saat proses pencucian, sehingga menimbulkan hasil negatif palsu. Adanya kontaminasi bakteri pada saline dapat menimbulkan hasil positif palsu (Green *et al.*, 2019).

7. Penambahan AHG

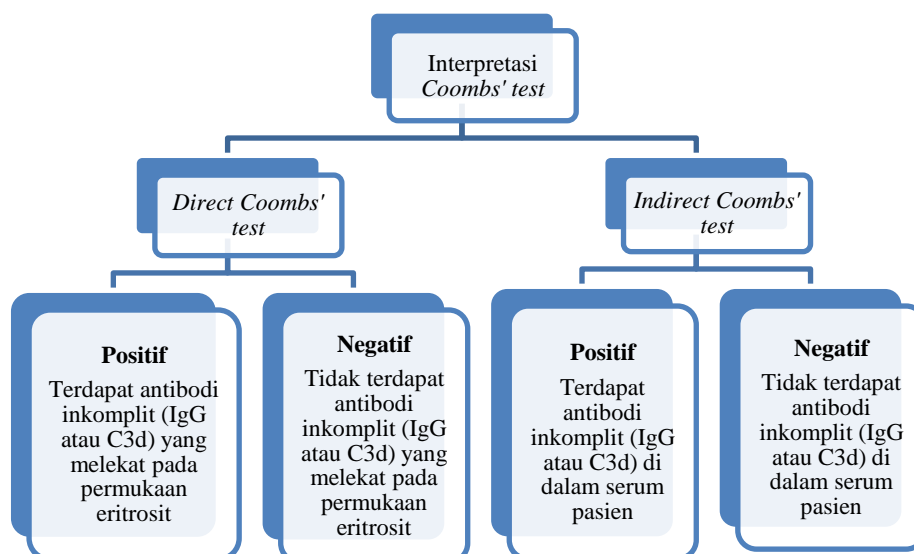
Penambahan AHG sebaiknya dilakukan segera setelah pencucian untuk meminimalisasi kesempatan antibodi lepas dari sel dan netralisasi reagen AHG. (Green *et al.*, 2019).

8. Sentrifugasi untuk pembacaan

Sentrifugasi merupakan langkah pemeriksaan yang krusial. Direkomendasikan menggunakan kecepatan 1.000 RCF selama 20 detik. (Green *et al.*, 2019).

#### IV. INTERPRETASI ANTIGLOBULIN TEST

Berikut adalah panduan interpretasi hasil pemeriksaan DAT maupun IAT (Gambar 6).



Gambar 6. Interpretasi Antiglobulin test (Jaime-Pérez & Almaguer-Gaona, 2016).

## V. SUMBER KESALAHAN ANTIGLOBULIN TEST

Berikut ini adalah beberapa hal yang dapat menyebabkan hasil *antiglobulin test* positif palsu maupun negatif palsu.

Hasil *antiglobulin test* positif palsu disebabkan oleh hal berikut:

### 1. *Specimen error*

- a) Spesimen tidak tepat (*refrigerated clotted specimens*) dapat menyebabkan perlekatan komplemen *in vitro*
- b) Menggunakan sampel serum untuk DAT
- c) Sampel yang ditampung dalam tabung SST dapat mengalami perlekatan komplemen
- d) Perlekatan komplemen ketika spesimen dikumpulkan dari jalur infus dengan larutan dekstroza

### 2. *Technical error*

- a) *Overcentrifugation* dan *over-reading* menyebabkan menyebabkan aglutinasi eritrosit terlalu padat
- b) Inkubasi berlebihan dengan *enzyme-treated cells*
- c) Sentrifugasi setelah inkubasi menggunakan PEG atau polimer bermuatan positif lainnya
- d) Penggunaan PEG atau media penguat lain yang tidak tepat
- e) Resuspensi endapan sel tidak adekuat
- f) Kontaminasi bakteri pada sel atau saline yang digunakan untuk mencuci
- g) Peralatan gelas yang kotor
- h) Saline terkontaminasi logam berat atau silika koloidal

### 3. Kondisi klinis tertentu atau kondisi darah pasien yang dapat menimbulkan kekeliruan

- a) Telah terjadi aglutinasi langsung sebelum penambahan reagen AHG karena adanya *cold agglutinin* yang kuat
- b) *Rouleaux formation*
- c) Adanya fibrin pada tabung menyerupai aglutinasi
- d) Sel dengan DAT positif akan menyebabkan IAT positif (Green *et al.*, 2019; Keir *et al.*, 2014; Nayak, 2020).

Hasil *antiglobulin test* negatif palsu disebabkan oleh hal berikut:

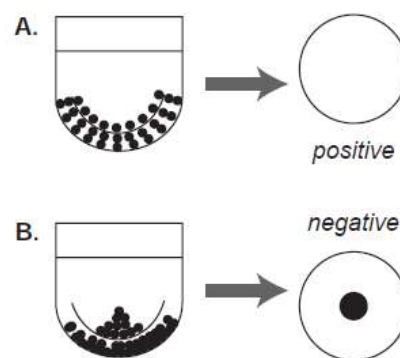
1. *Specimen error* dan faktor reagen
  - a) Panas berlebihan atau *freezing* dan *thawing* serum berulang
  - b) Rasio serum terhadap sel tidak ideal
  - c) pH saline rendah
  - d) Reagen AHG non reaktif karena deteriorasi atau netralisasi (penyimpanan reagen tidak tepat)
  - e) Kontaminasi AHG oleh *extraneous protein* (misal, sarung tangan, pipet yang salah)
2. *Technical error*
  - a) Reagen AHG, serum atau media *enhancement* tidak ditambahkan
  - b) Pencucian tidak adekuat sebelum penambahan reagen AHG, sehingga terjadi netralisasi reagen AHG oleh globulin yang tidak terikat
  - c) Kegagalan penambahan pencucian ketika menggunakan volume serum lebih banyak
  - d) Disosiasi dini IgG yang terikat dengan eritrosit karena keterlambatan pemeriksaan
  - e) Rasio serum terhadap sel terlalu rendah
  - f) *Undercentrifuged* atau *overcentrifuged*
  - g) Resuspensi endapan sel terlalu kuat
  - h) Disosiasi dini IgG yang terikat dengan eritrosit karena suhu pemeriksaan tidak tepat (misal saline atau AHG terlalu dingin atau panas)
  - i) Suspensi sel terlalu lemah atau terlalu kuat
  - j) Kondisi inkubasi tidak adekuat pada IAT
  - k) Teknik pembacaan yang buruk
3. Kondisi klinis tertentu atau kondisi darah pasien yang dapat menimbulkan kekeliruan
  - a) Konsentrasi tinggi paraprotein IgG pada serum
  - b) Terdapat antibodi jarang yang hanya terdeteksi dengan AHG polispesifik dan ketika terdapat komplemen aktif
  - c) Serum non reaktif karena deteriorasi komplemen (Green *et al.*, 2019; Keir *et al.*, 2014; Nayak, 2020)

## VI. MODIFIKASI ANTIGLOBULIN TEST

Saat ini terdapat berbagai modifikasi teknik *antiglobulin test* seperti penggunaan LISS, PEG, albumin, teknik *low ionic polybrene*, *enzyme-linked antiglobulin test (ELAT)*, otomatisasi dengan teknologi *solid phase* dan *gel test* (Green *et al.*, 2019).

### 6.1. TEKNOLOGI SOLID PHASE

Teknologi *solid phase* dapat dilakukan dengan menggunakan tabung atau *microplates*. Antibodi melekat pada *well microplate*, kemudian ditambahkan eritrosit. Jika antibodi tersebut spesifik untuk antigen eritrosit, maka bagian dasar *well* akan tertutup suspensi namun jika tidak terdapat spesifisitas, eritrosit akan tetap berada pada dasar *well*. Serum ditambahkan pada *well* yang dilapisi eritrosit, dan jika antibodi pada serum spesifik untuk antigen pada eritrosit, maka akan terjadi reaksi positif (Green *et al.*, 2019).



**Gambar 9. Interpretasi *microplate testing*.**

- a). Hasil positif: sel tersebar di seluruh *microplate* b). Hasil negatif: butiran sel berada di dasar *microplate* (Whitlock, 2010)

### 6.2. GEL TEST

Pada *gel test* deteksi reaksi antigen antibodi pada *microtube* yang diisi *polyacrylamide gel*. Gel berperan sebagai perangkap, dimana eritrosit bebas yang tidak teraglutinasi akan membentuk endapan pada dasar tabung, sedangkan eritrosit yang mengalami aglutinasi akan terperangkap pada tabung, sehingga hasil negatif ditunjukkan dengan adanya endapan pada dasar *microtube*, dan reaksi positif akan terfiksasi pada gel.

## VII. KESIMPULAN

*Antiglobulin test* merupakan pemeriksaan untuk mendeteksi adanya antibodi atau komplemen baik yang terikat pada permukaan eritrosit maupun bersirkulasi dalam serum/plasma. *Direct Antiglobulin Test* untuk mendeteksi sensitisasi *in vivo* sedangkan IAT mendeteksi antibodi yang bersirkulasi dalam plasma setelah dilakukan sensitisasi *in vitro*. Terdapat berbagai faktor yang mempengaruhi hasil *antiglobulin test* dan beberapa hal yang dapat menyebabkan hasil *antiglobulin test* positif palsu maupun negatif palsu. Saat ini terdapat berbagai modifikasi teknik *antiglobulin test* seperti penggunaan LISS, PEG, albumin, teknik *low ionic polybrene*, *enzyme-linked antiglobulin test (ELAT)*, otomatisasi dengan teknologi *solid phase* dan *gel test* dengan berbagai kelebihan dan kekurangannya.

## DAFTAR PUSTAKA

- Green, R.E.B., Slayten, J. and Rhees, J.R. (2019), "The Antiglobulin Test", in Harmening, D.M. (Ed.), *Modern Blood Banking & Transfusion Practices*, 7th ed., F. A. Davis Company, Philadelphia, pp. 103–110.
- Howard, P.R. (2021), *Basic and Applied Concepts of Blood Banking and Transfusion Practices*, 5th ed., Elsevier Inc, USA.
- Jaime-Pérez, J.C. and Almaguer-Gaona, C. (2016), "Rediscovering the Coombs test", *Medicina Universitaria*, Universidad Autónoma de Nuevo León, Vol. 18 No. 72, pp. 185–186.
- Keir, A., Agpalo, M., Lieberman, L. and Callum, J. (2014), "How to use: The direct antiglobulin test in newborns", *Archives of Disease in Childhood: Education and Practice Edition*, pp. 1–6.
- Leger, R.M. (2011), "The Positive Direct Antiglobulin Test and Immune-Mediated Hemolysis", in Roback, J.D.; Grossman, B.J.; Harris, T.; Hillyer, C.. (Ed.), *Technical Manual*, 17th ed., AABB, Maryland, pp. 497–522.
- Mehdi, S.. (2013), "Essentials of Blood banking (A Handbook for Students of Blood Banking and Clinical Residents)", Jaypee Brothers Medical Publishers (P) LTD, New Delhi.
- Mulyantari, N.K. and Yasa, I.W.P.S. (2016), *Laboratorium Pratreansfusi Update*, Udayana University Press, Denpasar.
- Nayak, R. (2020), "Antihuman Globulin Test", in Nayak, Ramadas, Nayak, R. (Ed.), *Manual of Transfusion Medicine*, New Delhi, pp. 173–187.
- Novotny, A. (2019), "Direct Antiglobulin Test", in Shaz, B.H., Hillyer, C.D., Gil, M.R. (Ed.), *Transfusion Medicine and Hemostasis Clinical and Laboratory Aspects*, 3rd ed., Elsevier Inc, United States, pp. 127–130.
- Parker, V. and Tormey, C.A. (2017), "The direct antiglobulin test: Indications, interpretation, and pitfalls", *Archives of Pathology and Laboratory Medicine*, Vol. 141 No. 2, pp. 305–310.
- Whitlock, S.. (2010), *Immunohematology for Medical Laboratory Technicians*, Delmar Cengage Learning, USA.



## **1.2. CASE STUDY OF ANTIGLOBULIN TEST**

Zelly Dia Rofinda

Departemen Patologi Klinik dan Kedokteran Laboratorium  
Fakultas Kedokteran Universitas Andalas / RSUP Dr. M. Djamil Padang

### **I. PENDAHULUAN**

Tes antiglobulin atau tes Coombs digunakan untuk menunjukkan adanya antibodi dan/atau komplemen yang terikat pada membran eritrosit ataupun yang bebas dalam plasma/serum pasien dengan menggunakan reagen anti-human globulin untuk membentuk reaksi aglutinasi yang terlihat. Terdapat dua bentuk tes antiglobulin yaitu *Indirect Antiglobulin Test* (IAT) dan *Direct Antiglobulin Test* (DAT). *Indirect antiglobulin test* dilakukan untuk mendeteksi antibodi yang beredar dalam plasma/serum pasien, sedangkan DAT untuk mendeteksi antibodi atau komplemen (umumnya C3d) yang terikat langsung pada eritrosit pasien yang menunjukkan sensitisasi *in vivo*. (Parker & Tormey, 2017).

Berbagai kasus yang berhubungan dengan destruksi eritrosit atau hemolitik dapat diidentifikasi berdasarkan hasil tes antiglobulin. *Direct antiglobulin test* akan membantu diagnosis anemia hemolitik autoimun, hemolisis yang diinduksi obat, *hemolytic disease of the fetus and newborn* (HDFN) dan reaksi alloimun terhadap eritrosit yang baru saja ditransfusikan (Fung *et al.*, 2014). *Indirect antiglobulin test* digunakan untuk mengidentifikasi antibodi dalam plasma/serum pasien yang mendapat transfusi berulang atau sebagai bagian dari pengujian antenatal untuk membantu menilai kemungkinan antibodi yang menyebabkan kerusakan eritrosit janin (Geoff & Imelda, 2013).

### **II. CASE STUDY**

#### **2.1. KASUS 1**

Seorang pasien perempuan, usia 32 tahun, dengan keterangan klinis dugaan anemia hemolitik autoimun e.c *Systemic Lupus Erythematosus* (SLE). Hasil pemeriksaan hematologi pada pasien ini didapatkan anemia normositik normokrom dengan retikulositosis.

**Tabel 2.1. Hasil tes antiglobulin pasien *Autoimmune hemolytic Anemia (AIHA)***

Golongan darah	Rhesus	DAT	IAT	Autocontrol	Metode
AB	positif	2+	2+	2+	<i>Column agglutination test / gel test</i>

Kesan: Golongan darah AB Rh positif, Antiglobulin tes positif



**Gambar 2.1. Hasil tes antiglobulin metode gel:**  
IAT 2+, DAT 2+, *autocontrol* 2(+). (foto dokumen pribadi)

Hasil DAT yang positif pada pasien menandakan terdapat antibodi dan atau komplemen (C3d) pada permukaan eritrosit, sedangkan hasil IAT positif menunjukkan adanya antibodi ireguler bebas didalam serum pasien. Tes antiglobulin pertamakali menggunakan reagen polispesifik yaitu yang dapat mendeteksi IgG dan komplemen sekaligus. Selanjutnya pada pasien ini dianjurkan pemeriksaan antiglobulin monospesifik untuk menentukan apakah yang berikatan dengan eritrosit itu IgG saja, komplemen saja atau keduanya.

Antibodi yang melekat pada eritrosit pasien SLE merupakan autoantibodi. Patogenesis SLE merupakan proses yang kompleks. Adanya potensi genetik disertai faktor lingkungan berperan dalam aktivasi respon imun. Pada individu dengan gen yang berisiko SLE, kerusakan sel yang disebabkan oleh infeksi maupun faktor lingkungan seperti paparan sinar UV, akan mengalami proses pembersihan apoptosis yang tidak berjalan dengan sempurna. Baik karena makrofag tidak mampu secara cepat membersihkan hasil apoptosis ataupun akibat defisiensi atau kekurangan komplemen (Bertsias Goerge *et al*, 2023).

Gangguan pada apoptosis menyebabkan antigen sel tubuh bertahan lebih lama sehingga bisa dikenali oleh *antigen presenting cell* (APC) seperti sel dendritik. Sel dendritik kemudian memproses antigen ini dan menjadi teraktivasi untuk membawa

antigen tersebut ke kelenjar getah bening regional. Meningkatnya sisa produk apoptosis ini juga dapat memicu makrofag mengeluarkan sitokin berupa IFN- $\alpha$ . IFN- $\alpha$  yang dapat mempercepat proses maturasi sel dendritik sehingga pengenalan antigen dari apoptosis berlangsung lebih cepat (Choi *et al*, 2013; Moulton *et al*, 2017).

Ketika sel APC masuk ke kelenjar getah bening, sel APC akan bereaksi dengan sel limfosit T helper atau CD4. Proses ini membuat sel T helper menjadi matur dan aktif. Sel T helper kemudian mengaktifasi sel B dengan bantuan CD40 dan IL-21. Sel B selanjutnya aktif berproliferasi menjadi sel B memori yang akan mengingat antigen seumur hidup atau menjadi sel plasma. Sel plasma yang kemudian akan memproduksi autoantibodi yang pada gilirannya akan bereaksi dengan antigen tubuh dan menimbulkan kerusakan (Choi *et al*, 2013).

Autoantibodi yang diproduksi oleh sel plasma akan beredar dalam darah dan mulai menyerang antigen tubuh penderita. Autoantibodi yang menangkap antigen yang beredar dalam darah membentuk kompleks antigen-antibodi. Autoantibodi akan mengaktifasi sistem inflamasi sehingga kemudian menyebabkan kerusakan organ yang ditargetkannya. Kerusakan organ dan sel yang terjadi akan semakin menambah dilepaskannya antigen ke dalam darah. Antigen yang beredar ini akan menginduksi sel B memori dan kemudian dengan cepat membelah dan membentuk lebih banyak sel plasma. Sel plasma ini kemudian akan memproduksi lebih banyak lagi autoantibodi sehingga reaksi peradangan dan gejala SLE semakin berat (Choi *et al*, 2013; Moulton *et al*, 2017).

## **2.2. KASUS 2**

Seorang pasien laki-laki, usia 54 tahun dengan keterangan klinis anemia berat e.c. *chronic kidney disease* (CKD) stage 5 dilakukan tes antiglobulin oleh karena pada pemeriksaan pretransfusi untuk tindakan hemodialisis didapatkan hasil inkompatibel mayor. Golongan darah pasien dan donor sudah sesuai. Pasien diketahui sering mendapatkan tranfusi sebelum tindakan hemodialisis.

**Tabel 2.2. Hasil pemeriksaan *crossmatch* pasien CKD**

	<b>Golongan Darah</b>	<b>Mayor</b>	<b>Minor</b>	<b>Autocontrol</b>	<b>Metode</b>
Pasien	A Rh(+)			negatif	<i>Column agglutination test / gel test</i>
Donor 1		2+	negatif		
Donor 2		1+	negatif		

Kesan: Golongan darah A Rh(+), Inkompatibel mayor

**Tabel 2.3. Hasil tes antiglobulin pasien CKD**

<b>Golongan darah</b>	<b>Rhesus</b>	<b>DAT</b>	<b>IAT</b>	<b>Autocontrol</b>	<b>Metode</b>
A	positif	negatif	2+	negatif	<i>Column agglutination test / gel test</i>

Kesan: Golongan darah A Rh(+), IAT positif



**Gambar 2.2. Hasil tes antiglobulin metode gel test pasien CKD: IAT 2+, DAT negatif, *autocontrol* negatif. (foto dokumen pribadi).**

Hasil IAT yang positif menunjukkan adanya antibodi ireguler di dalam plasma/serum pasien. Antibodi ireguler tersebut diduga suatu alloantibodi yang terbentuk oleh karena adanya riwayat transfusi berulang pada pasien. Tahap selanjutnya yang diperlukan adalah melakukan skrining dan identifikasi antibodi untuk menentukan tipe antibodi yang terdapat di dalam plasma/serum pasien dengan tujuan ketika pasien membutuhkan transfusi berikutnya diharapkan mendapatkan donor dengan antigen negatif.

Transfusi darah merupakan bagian integral dalam penatalaksanaan pasien CKD, tetapi risiko infeksi menular lewat transfusi (*Transfusion Transmissible Infections/TTI*) dan alloimunitisasi merupakan komplikasi potensial terutama pada pasien yang menerima banyak transfusi (Molina-Aguilar *et al*, 2019). Alloimunitisasi adalah komplikasi dari

transfusi eritrosit dengan konsekuensi terjadinya reaksi transfusi hemolitik, kesulitan mendapatkan darah yang cocok untuk transfusi di masa depan dan tertundanya atau kegagalan dalam mendapatkan transplantasi ginjal (Bhuva & Vachhani, 2017).

Alloimunitisasi eritrosit merupakan respon imun humoral yang terjadi ketika antibodi berikatan dengan antigen eritrosit asing akibat perbedaan antigenik antara donor dan penerima. Transfusi eritrosit biasanya diberikan secara rutin dengan kesesuaian fenotip “ABO” dan RhD antara penerima dan donor, sehingga antigen eritrosit lainnya yang dihubungkan dengan pembentukan alloantibodi, yang disebut proses alloimunitisasi (Kaur *et al*, 2017). Syarat utama terjadinya alloimunitisasi adalah paparan antigen eritrosit donor yang tidak ada pada penerima, antigen ini memiliki kemampuan untuk memulai pembentukan antibodi terhadap eritrosit sehingga mengakibatkan reaksi transfusi yang berpotensi serius (Bhuva & Vachhani, 2017).

Alloimunitisasi merupakan komplikasi penting pada pasien yang menjalani transfusi berulang, meskipun kadar alloantibodi dapat berkurang seiring berjalannya waktu (evanescence) dan diabaikan dalam penentuan selanjutnya, tetapi hal ini tidak menghalangi kemungkinan terjadinya reaksi transfusi yang parah (Molina-Aguilar *et al*, 2019).

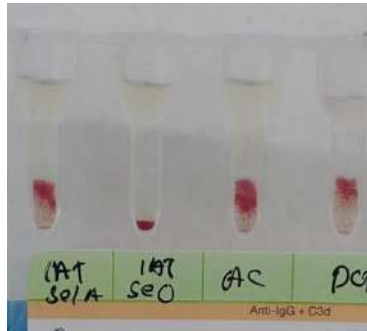
### 2.3. KASUS 3

Bayi perempuan usia 2 hari dengan gejala klinis kuning hampir seluruh tubuh, kadar bilirubin total dan bilirubin indirek meningkat. Bayi kemudian dilakukan tes antiglobulin untuk menelusuri penyebab ikterusnya. Pemeriksaan golongan darah bayi didapatkan A Rhesus positif, sedangkan golongan darah ibunya O Rhesus positif. Bayi diduga mengalami ikterus neonatorum akibat inkompatibilitas ABO.

**Tabel 2.4. Hasil tes antiglobulin bayi dengan ikterus neonatorum**

Golongan darah	DAT	IAT		Autocontrol	Metode
		Sel O	Sel A		
A Rh(+)	2+	negatif	2+	2+	<i>Column agglutination test / gel test</i>

Kesan: Golongan darah A Rh(+), DAT positif dan IAT sel segolongan positif



**Gambar 2.3. Hasil tes antiglobulin metode gel pada bayi dengan ikterus neonatorum:**

IAT dengan sel A (sel segolongan) 2+, IAT dengan sel O negatif, DAT 2+, *autocontrol* 2+. (foto dokumen pribadi).

Hasil DAT yang positif menunjukkan bahwa eritrosit bayi telah diselubungi oleh antibodi yang berasal dari ibu. Ibu dengan golongan darah O memiliki kedua antibodi anti-A dan anti-B. Pembuktian adanya antibodi ibu di dalam sirkulasi bayi yaitu dari hasil IAT dengan sel segolongan bayi yang memberikan hasil positif. Penambahan pemeriksaan IAT dengan sel segolongan bayi diperlukan dalam penelusuran penyebab ikterus neonatorum. Hasil IAT dengan sel A (sel segolongan bayi) pada pasien ini positif oleh karena anti-A yang berasal dari ibu bereaksi dengan antigen A yang dimiliki bayi.

Inkompatibilitas ABO secara umum terjadi akibat adanya reaksi antibodi dalam plasma yang berikatan dengan antigen pada permukaan sel eritrosit. Individu dengan golongan darah A memiliki antibodi anti-B, golongan darah B memiliki antibodi anti-A, golongan darah AB tidak memiliki keduanya, dan golongan darah O memiliki antibodi anti-A dan anti-B. Inkompatibilitas ABO hanya terjadi pada ibu dengan golongan darah O (Wagle, 2017). Antibodi anti-A dan anti-B yang dibentuk oleh ibu golongan darah O adalah tipe imunoglobulin G (IgG), yang dapat dengan mudah melewati plasenta pada janin, sementara anti-A dan anti-B yang dibentuk oleh individu kelompok A dan B adalah tipe IgM, yang tidak dapat melewati plasenta ke janin, sehingga membatasi paparan antibodi (Dean, 2005).

Eritrosit janin dalam beberapa insiden dapat masuk ke dalam sirkulasi darah ibu pada saat hamil yang dinamakan *Fetomaternal Microtransfusion*. Hemolisis yang dihubungkan dengan inkompatibilitas ABO, secara eksklusif terjadi pada ibu golongan darah O, dengan fetus memiliki golongan darah A atau B. Satu persen ibu dengan golongan darah O, memiliki titer antibodi IgG yang tinggi melawan baik antigen A maupun B (Wagle, 2017).

Antibodi anti-A dan anti-B ibu melewati plasenta, kemudian berikatan dengan eritrosit janin dan mengaktifkan kaskade komplemen. Hal ini akan melisis sel eritrosit saat masih berada dalam sirkulasi janin dan mengakibatkan katabolisme heme, sehingga terjadi peningkatan produksi bilirubin indirek. Eritrosit janin yang tersensitisasi dihancurkan di limpa sehingga mengakibatkan hiperbilirubinemia (Nair & Lakshmi, 2017). Saat bilirubin indirek semakin banyak dan hati tidak mampu membersihkannya dengan cukup cepat, sehingga bilirubin indirek terakumulasi pada neonatus. Peningkatan kadar bilirubin indirek yang sangat tinggi dapat menyebabkan kerusakan neurologis permanen, gangguan pendengaran, dan berpotensi menyebabkan kematian jika tidak ditangani dengan cepat (Patel *et al*, 2017).

#### 2.4. KASUS 4

Seorang pasien anak laki-laki, usia 4 tahun, dengan keterangan klinis talasemia mayor dilakukan tes anti globulin karena diduga juga mengalami anemia hemolitik autoimun.

**Tabel 2.5. Hasil tes antiglobulin pasien talasemia mayor**

Golongan darah	Rhesus	DAT	IAT	Autocontrol	Metode
O	positif	2+	negatif	1+	<i>Column agglutination test / gel test</i>

Kesan: Golongan darah O Rh(+), DAT positif



**Gambar 2.4. Hasil tes antiglobulin polispesifik metode gel test pasien talasemia: IAT negatif, DAT 2+, autocontrol 1+. (foto dokumen pribadi).**

Selanjutnya dilakukan tes antiglobulin monospesifik pada pasien tersebut dan didapatkan hasil sebagai berikut:



**Gambar 2.5. Hasil tes antiglobulin monospesifik pasien talasemia didapatkan hasil positif pada IgG. (foto dokumen pribadi).**

Talasemia adalah kelainan darah yang disebabkan oleh mutasi DNA pada sel yang bertugas memproduksi hemoglobin. Hemoglobin terdiri dari cincin heme besi dan empat rantai globin, dua rantai alfa, dan dua rantai beta (atau gamma). Klasifikasi jenis talasemia bergantung pada jumlah mutasi gen dan bagian molekul hemoglobin – alfa atau beta – yang terpengaruh (Tamer *et al*, 2016).

Penyakit dan pengobatannya juga dapat menyebabkan perubahan dalam fungsi kekebalan tubuh dan kaitannya dengan berbagai penyakit autoimun telah sering dikemukakan. Penyebab utama kesakitan dan kematian pada pasien talasemia adalah infeksi, yang diduga disebabkan oleh perubahan imunologi. Komplikasi terpenting dari talasemia adalah infeksi akibat transfusi atau splenektomi, trombositopenia akibat hipersplenisme, neutropenia, beban zat besi kronis, hemosiderosis pada hati, miokardium, limpa, dan organ endokrin (Georges *et al*, 2021).

Semakin banyak laporan yang menunjukkan adanya hubungan antara talasemia dan penyakit autoimun melalui hubungan dengan mutasi spesifik dan jalur molekuler yang terdapat pada pasien dengan talasemia dan pasien dengan penyakit autoimun. Kedekatan gen penting yang terlibat dalam regulasi imun dengan lokus gen  $\beta$ -globin dan perubahan konsentrasi hemorfin merupakan salah satu hipotesis penjelasan mengenai hubungan ini. Pasien talasemia dapat mengalami perubahan imunitas seluler seperti fungsi efektor bawaan fagosit yang rusak, penghambatan diferensiasi limfosit, dan perubahan rasio limfosit CD8+/CD4+. Beberapa perubahan ini juga disebabkan oleh pengobatan yang dijalani pasien thalassemia. Misalnya, transfusi darah mengubah konsentrasi molekul ligan Fas dan efek imunomodulasi *in vitro*, dan dapat menginduksi apoptosis berbagai leukosit. Kelasi besi juga dapat mengurangi peradangan dan meningkatkan hasil peradangan sehingga terjadinya sepsis (Georges *et al*, 2021).



### III. KESIMPULAN

Tes antiglobulin dapat mengidentifikasi kasus yang berhubungan dengan destruksi eritrosit atau hemolitik. *Direct antiglobulin test* akan membantu diagnosis anemia hemolitik autoimun, hemolisis yang diinduksi obat, *hemolytic disease of the fetus and newborn* (HDFN) dan reaksi alloimun terhadap eritrosit yang baru saja ditransfusikan. *Indirect antiglobulin test* digunakan untuk mengidentifikasi antibodi dalam plasma/serum pasien yang mendapat transfusi berulang atau sebagai bagian dari pengujian antenatal untuk membantu menilai kemungkinan antibodi yang menyebabkan kerusakan eritrosit janin.

Hasil tes antiglobulin dapat berupa DAT atau IAT saja yang positif, atau keduanya. Pemeriksaan IAT dengan melakukan inkubasi dengan sel golongan O secara *in vitro*. Penambahan pemeriksaan IAT dengan sel segolongan diperlukan untuk menelusuri penyebab ikterus neonatorium akibat inkompatibilitas golongan darah ABO.

### DAFTAR PUSTAKA

Bertsias George et al. Systemic Lupus Erythematosus: Pathogenesis and Clinical Features. Eular On-line Course Rheum Dis. Access in October 2023 :476–505.

Bhuva DK, Vachhani JH. Red cell alloimmunization in repeatedly transfused patients (2017). Asian J Transfus Sci. Jul-Dec; 11(2): 115–20.

Choi J, Kim ST, Craft J (2013). The Pathogenesis of SLE – an Update. Curr Opin Immunol;24(6):651–7.

Dean L. ed (2005). The ABO blood group. Blood Groups and Red Cell Antigens. Bethesda, MD: National Center for Biotechnology Information: 1-6. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK2261>. Accessed March 31, 2020.

Fung, M.K., Grossman, B.J., Hilyer, C.D., & Westhoff, C.M. (2014). AABB Technical Manual 18<sup>th</sup> edition.

Geoff, D., & Imelda, B. (2013). Essential Guide to Blood Groups 3<sup>rd</sup> edition.

Georges EH, Khaled MM, Imad Uthman, Maria DC, Ali T. Taher (2021). Thalassemia and autoimmune diseases: Absence of evidence or evidence of absence? DOI: [10.1016/j.blre.2021.100874](https://doi.org/10.1016/j.blre.2021.100874)

Kaur D, Bains L, Kandwal M, Parmar I (2017). Erythrocyte alloimmunization and autoimmunization among blood donors and recipients. J Clin Diagn Res: Mar; 11(3):EC12–5.

Moulton VR, Suarez-Fueyo A, Meidan E, Li H, Mizui M, Tsokos GC (2017). Pathogenesis of Human Systemic Lupus Erythematosus: A Cellular Perspective. *Trends Mol Med*. Jul;23(7):615–35.

Molina-Aguilar, R., Gómez-Ruiz, S., Vela-Ojeda, J., Montiel-Cervantes, L. A., & Reyes-Maldonado, E. (2019). *Pathophysiology of Alloimmunization. Transfusion Medicine and Hemotherapy*, 1–8. doi:10.1159/000501861.

Nair S, Lakshmi B. Abo incompatibility and neonatal outcome with reference to hemolytic disease of newborn (2017). *JMed Sci Clin Res*;5(1):16065-16068. doi:10.18535/jmscr/v5o1.133.

Parker, V. and Tormey, C.A. (2017), “The direct antiglobulin test: Indications, interpretation, and pitfalls”, *Archives of Pathology and Laboratory Medicine*, Vol. 141 No. 2, pp. 305–310.

Patel AS, Desai DA, Patel, AR (2017). Association of ABO and RH incompatibility with neonatal hyperbilirubinemia. *Int J Reprod Contracept Obstet Gynecol*;6(4):1368-1375. doi:10.18203/2320-1770.

Tamer Hasan, Badr Mohamed, Usama ES, etc (2016).  $\beta$ - Thalassemia Genotypes and Fenotypes; <http://dx.doi.org/10.5772/64644>

Wagle, S (2017). Hemolytic disease of the newborn. Medscape. <https://emedicine.medscape.com/article/974349> overview. Updated December 28. Accessed March 31, 2020.

## **BAB 2**

### **PRP TREATMENT AND FIBRIN GLUE**

#### ***2.1. CLINICAL APPLICATION AND LEGAL ISSUE OF PRP (PLATELET-RICH PLASMA), PRF (PLATELET-RICH FIBRIN) TREATMENT, AND FIBRIN GLUE***

Yulia Nadar Indrasari  
Departemen-KSM Patologi Klinik FK Universitas Airlangga-RSUD Dr. Soetomo  
Surabaya

#### **1. PENDAHULUAN**

Artikel mengenai *platelet-rich plasma* (PRP) dipublikasikan pertama kali sekitar tahun 1950-an di *PubMed* yang menunjukkan kenaikan jumlah minat penelitian secara eksponensial selama 7 dekade terakhir (Yaman and Kinard, 2022). Penggunaan PRP secara sederhana dilaporkan pada berbagai kasus medis secara konstan pada tahun 1970-an, misalnya pada kasus regenerasi jaringan, penyembuhan luka, *repair* ligamen, kerontokan rambut, dan yang lainnya (Cao *et al.*, 2021).

PRP merupakan bagian dari plasma darah *autogenous*, dimana preparasi dan mekanisme kerja PRP dalam aplikasi klinis sangat membantu dokter (klinisi) dalam pemahaman terapi tersebut (Cao *et al.*, 2021). PRP terdiri dari konsentrat trombosit pekat yang tersuspensi dalam plasma dan diperoleh melalui sentrifugasi *anticoagulated whole blood*. Sebagian besar produk PRP mengandung konsentrasi trombosit yang lebih tinggi dibandingkan *native blood* dengan rentang antara 2-12x dari konsentrasi *baseline*. Namun, ada beberapa studi yang mengidentifikasi konsentrasi trombosit dengan level 0,52x dari konsentrasi *baseline* meskipun telah melakukan upaya standarisasi protokol dan preparasi metode (Yaman and Kinard, 2022).

*Platelet-rich fibrin* (PRF) merupakan matriks fibrin dimana sitokin trombosit, faktor pertumbuhan, dan sel-sel yang terperangkap kemudian dilepaskan dalam waktu tertentu dan berfungsi sebagai membran yang dapat diresorpsi. Choukroun dan rekan-rekan termasuk di antara pionir yang menggunakan protokol PRF dalam kasus bedah mulut dan maksilofasial untuk meningkatkan penyembuhan tulang di bidang kedokteran gigi implan. *Autologous PRF* dianggap sebagai biomaterial penyembuhan, dan saat ini penelitian telah menunjukkan aplikasinya di dalam berbagai disiplin ilmu kedokteran gigi (Naik *et al.*, 2013).

*Fibrin glue* dan *Platelet-rich fibrin* merupakan produk inovatif di bidang kedokteran yang digunakan di dunia medis dan pembedahan. *Fibrin glue* atau *fibrin sealant* atau *tissue adhesive* telah banyak digunakan untuk penutupan luka kulit, *tissue barrier*, dan pembedahan sejak pertengahan abad ke-20. Sejak saat itu, metode ini telah banyak menggantikan *traditional sutures* dalam bentuk *staples* dan klip. Namun, berbagai studi perlu dilakukan untuk mengkonfirmasi penerapan klinis dari produk tersebut termasuk evaluasi pembiayaan dan dampaknya di pelayanan kesehatan pasien rawat jalan (Win *et al.*, 2021). Tujuan penulisan makalah ini yaitu memahami aplikasi klinis *fibrin glue*, PRP, dan PRF dan permasalahan yang dapat ditimbulkan ketika diterapkan pada pelayanan kesehatan.

## **2. PRP (PLATELET-RICH PLASMA)**

### **2.1. APLIKASI KLINIS PRP (PLATELET-RICH PLASMA)**

*Platelet-rich plasma* makin populer digunakan dalam berbagai aplikasi klinis di bidang medis sebagai perawatan non-operatif, karena kemampuannya dalam hal penyembuhan dan regenerasi jaringan. *Autologous* PRP berasal dari darah pasien sendiri yang disentrifugasi kemudian menghilangkan komponen eritrosit. Plasma darah yang tersisa mengandung konsentrasi *growth factors* yang lebih tinggi 5-10x tinggi dibandingkan *whole blood*. Platelet kaya akan *growth factors* dan protein bioaktif lainnya. Platelet mampu menstimulasi perbaikan dan regenerasi jaringan (Dawood and Salem, 2018).

Teori yang mendasari modalitas pengobatan ini berasal dari proses penyembuhan alami, sebagai respons pertama tubuh terhadap cedera jaringan, yaitu *deliver* trombosit ke area luka. Trombosit meningkatkan penyembuhan dan menarik sel punca ke area cedera. Ilmu dasar yang kemudian beralih ke praktek klinis, aplikasi injeksi PRP telah diterapkan pada pasien yang mengalami cedera ligamen, tendon, dan sendi, dengan hasil yang luar biasa (Dawood and Salem, 2018). Aplikasi PRP dapat digunakan dalam kondisi klinis berikut ini (Medicine, 2023):

#### (1) Ortopedi

- a. Osteoarthritis: injeksi PRP ke dalam sendi seperti area lutut, panggul, maupun sendi bahu dapat mengurangi nyeri dan perbaikan fungsi sendi pada pasien osteoarthritis.

- b. Cedera tendon dan ligament: PRP digunakan dalam perawatan kondisi tendonitis Achilles, *rotator cuff tear*, *tennis elbow*, serta mempercepat penyembuhan dan mengurangi rasa nyeri pada cedera tersebut.
- (2) Kedokteran olahraga
- a. Cedera otot: PRP dapat diinjeksikan ke dalam robekan otot atau kondisi otot yang tegang untuk mempercepat penyembuhan dan mengurangi waktu henti bagi atlet.
  - b. Cedera tendon: PRP biasanya digunakan sebagai perawatan kondisi *patellar tendinopathy* (jumper's knee) dan *achilles tendinopathy* pada atlet.
- (3) Dermatologi dan Estetika
- a. Restorasi rambut: injeksi PRP ke dalam kulit rambut dapat menstimulasi folikel rambut, sehingga berpotensi memicu pertumbuhan kembali rambut pada kasus *androgenetic alopecia* (pola kebotakan pria dan wanita).
  - b. Peremajaan wajah: PRP digunakan secara kombinasi dengan *microneedling* atau sebagai perawatan mandiri untuk memperbaiki tekstur kulit, mengurangi garis halus, dan meningkatkan produksi kolagen kulit.
- (4) Kedokteran gigi
- a. Pembedahan mulut: PRP dapat membantu proses penyembuhan setelah penempatan *implant* gigi, cangkok tulang, dan prosedur bedah lainnya.
  - b. Penyakit periodontal: PRP dapat digunakan dalam menunjang terapi periodontal tradisional yaitu meningkatkan regenerasi jaringan.
- (5) Penyembuhan luka
- a. Luka kronis: PRP dapat diaplikasikan secara topikal atau injeksi ke dalam luka yang sulit sembuh seperti *diabetic ulcer* dan *pressure sores* untuk mempercepat penyembuhan dan penutupan jaringan.
  - b. Incisi pembedahan: PRP dapat diaplikasikan untuk mempercepat penyembuhan luka setelah prosedur pembedahan tertentu.
- (6) Manajemen nyeri: PRP dapat digunakan dalam manajemen tata laksana kondisi nyeri kronis, seperti *plantar fasciitis* dengan cara mengurangi inflamasi dan mempercepat penyembuhan jaringan.
- (7) Oftalmologi: PRP telah diteliti dan berpotensi sebagai pengobatan dalam penyembuhan ulkus kornea.

## 2.2. LEGAL ISSUE PADA PENGGUNAAN PRP DI DUNIA MEDIS

Hal penting yang perlu diingat bahwa meskipun PRP menjanjikan dalam penerapan klinisnya, efektivitas penggunaan PRP dapat bervariasi dari satu pasien ke pasien lainnya, sehingga diperlukan lebih banyak penelitian untuk menetapkan protokol standar dan menentukan manfaat jangka panjangnya. Selain itu, PRP biasanya dianggap sebagai pilihan pengobatan yang aman karena berasal dari darah pasien sendiri, sehingga mengurangi risiko reaksi alergi atau penularan penyakit. Namun, seperti halnya prosedur medis lainnya, prosedur ini harus dilakukan oleh tenaga kesehatan terlatih dengan mengikuti pedoman dan pertimbangan yang sesuai untuk setiap kondisi tertentu.

## 3. PRF (PLATELET-RICH FIBRIN)

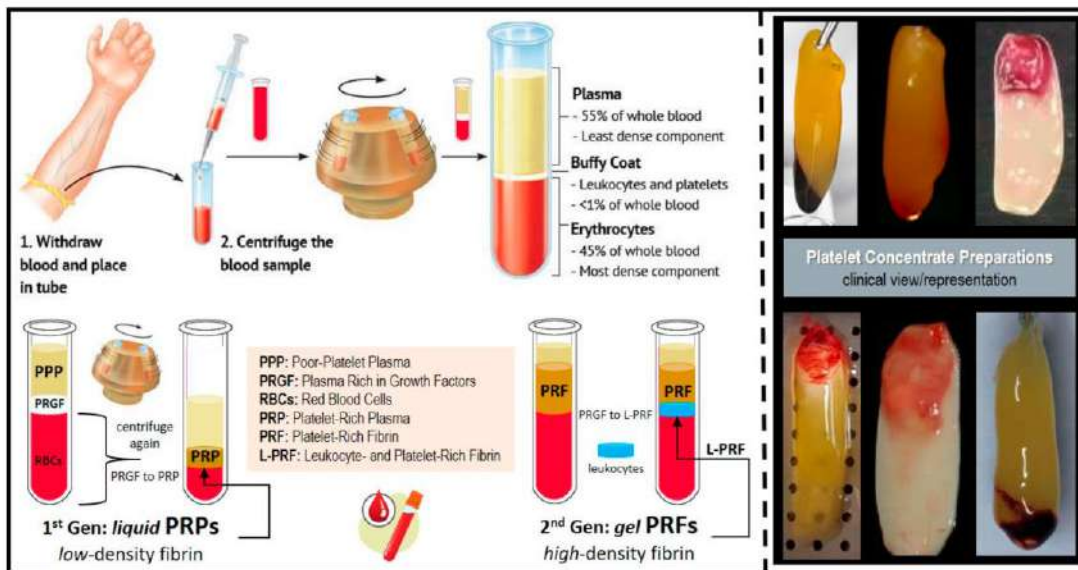
*Platelet-rich fibrin* merupakan suatu biomaterial fibrin *autogenous* 3-dimensi yang didapatkan dari prosedur sentrifugasi cepat dan sederhana yang berasal dari sampel *whole blood* pasien tanpa antikoagulan, *bovine thrombin*, zat aditif, maupun *gelifying agents* (Zumarán *et al.*, 2018). Komponen PRF kaya akan leukosit dan trombosit yang berperan sebagai *binding site* bagi *growth factor* dan trombosit. PRF mampu mendorong regenerasi jaringan dengan cara meningkatkan konsentrasi lokal *growth factor* pada jaringan tertentu (spesifik) (Grecu *et al.*, 2019b).

### 3.1. APLIKASI KLINIS PRF

*Platelet-rich fibrin* merupakan suatu sediaan biomaterial yang berasal dari darah pasien sendiri, yang mengandung konsentrat trombosit, *growth factors*, dan substansi bioaktif lainnya. PRF berperan dalam berbagai aplikasi medis dan kedokteran gigi. Berikut aspek penting yang perlu dipertimbangkan dalam aplikasi klinis PRF:

- (1) Regenerasi jaringan: PRF terutama dikenal karena sifat regeneratifnya. PRF mengandung trombosit konsentrasi tinggi, yang melepaskan *growth factors* yang merangsang perbaikan dan regenerasi jaringan. PRF sangat bermanfaat di bidang bedah mulut, ortopedi, dan dermatologi dalam hal percepatan penyembuhan.
- (2) *Autologous*: PRF berasal dari darah pasien sendiri sehingga dapat mengurangi risiko reaksi imun atau transmisi penyakit.
- (3) Sederhana untuk digunakan: mempersiapkan PRF relatif mudah dan dapat dilakukan di klinik medis atau klinik gigi. Cara pembuatan dengan sentrifugasi *whole blood* untuk mengkonsentrasikan trombosit.

(4) Aplikatif: PRF telah diaplikasikan di berbagai prosedur termasuk pemasangan implant gigi, cangkok gigi, perbaikan luka, dan peremajaan wajah.



**Gambar 1.** Sediaan klinis konsentrat trombosit, jenis/kelas, dan ilustrasi/presentasi klinis dari beberapa preparat *platelet-rich fibrin* (PRF) dan *leukocyte and platelet-rich fibrin* (L-PRF) (membran) (Zumarán *et al.*, 2018).

'Produk' yang dihasilkan dari sentrifugasi sampel *whole blood* adalah *autologous blood extract*, yang disebut juga konsentrat trombosit (**Gambar 1**). Preparasi sediaan yang dapat digunakan secara klinis (*surgical adjuvants*), teknik prosedur dapat memperkuat, mempercepat, memicu penyembuhan dan regenerasi jaringan luka (lunak dan keras) karena potensi kemampuan PRF dalam mengumpulkan konsentrat trombosit dan konstituen darah terapeutik lainnya (fibrinogen/fibrin, *growth factors*, leukosit, dan *circulating cells*) (Zumarán *et al.*, 2018).

PRF dapat mempercepat proses penyembuhan ketika digunakan dalam berbagai cedera ortopedi dan cedera terkait olahraga. Hal ini termasuk perbaikan tulang rawan, *rotator cuff surgery*, dan operasi ligamen anterior. Namun, data yang bertentangan mengenai manfaat ini telah dilaporkan, kemungkinan besar disebabkan oleh ketidakkonsistenan dalam protokol persiapan PRF dan regimen dosis. Meskipun demikian, literatur secara umum mendukung penggunaan PRF sebagai *adjuvant* yang bermanfaat untuk berbagai cedera otot, tendon, tulang, atau jaringan lunak kronis lainnya. Uji klinis lebih lanjut untuk memastikan manfaat ini sangat diperlukan dalam



persiapan PRF dan klasifikasi hasil klinis yang berhasil agar dapat memanfaatkan potensi PRF secara optimal (Grecu *et al.*, 2019).

Konsensus yang mengklasifikasikan 4 sub-famili konsentrat trombosit dipublikasikan pertama kali pada tahun 2009, berdasarkan perbedaan komponen biologisnya (sel dan fibrin), *gelification*, aspek aplikasinya, yaitu: *pure platelet-rich plasma* (P-PRP), *leukocyte and platelet-rich plasma* (L-PRP), *pure platelet-rich fibrin* (P-PRF), dan *leukocyte and platelet-rich fibrin* (L-PRF). Pada pembedahan oral dan maksilofasial, PRF sangat dipertimbangkan karena alasan preparasi yang cepat dan sederhana, *user-friendliness*, dan efektivitas biaya (Zumarán *et al.*, 2018).

### **3.2.LEGAL ISSUE PRF**

Penelitian lebih lanjut diperlukan untuk konfirmasi efektivitas PRF di dalam aplikasi klinisnya, meskipun terdapat bukti penggunaan PRF yang menjanjikan dan beberapa studi klinis yang mendukung kemanjuran PRF. Realisasi protokol PRF bergantung langsung pada penanganan terutama saat pengambilan darah dan pemindahan ke mesin sentrifugasi. Hal penting lainnya yang menjadi pertimbangan adalah jumlah akhir PRF yang tersedia mungkin rendah karena merupakan darah autologous sehingga peran klinisi yang berpengalaman dalam penggunaan PRF juga penting dipertimbangkan dalam aplikasi klinisnya. Pasien dengan kelainan perdarahan atau penyakit hematologi tidak memenuhi syarat untuk menjalani prosedur PRF di fasilitas kesehatan (Anonym, 2019).

## **4. FIBRIN GLUE**

### **4.1.APLIKASI KLINIS FIBRIN GLUE**

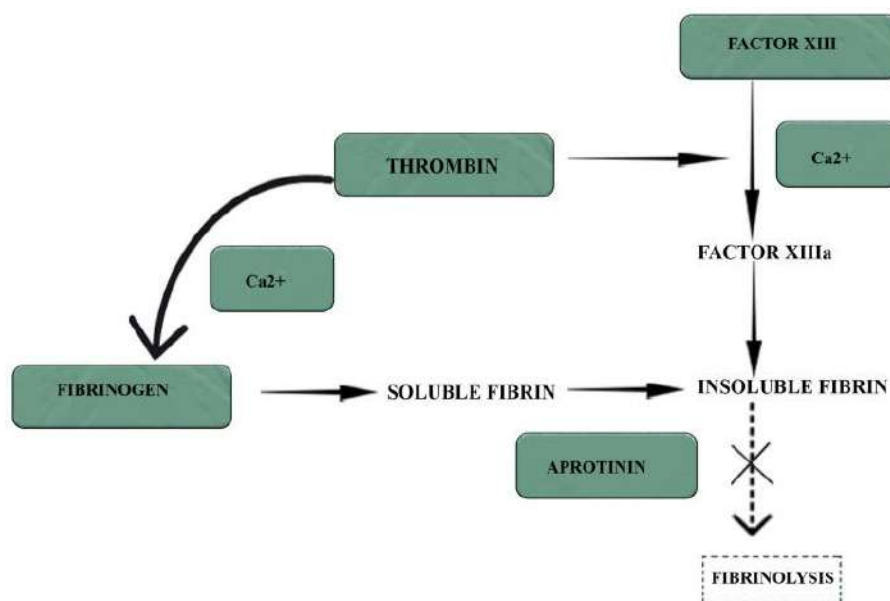
*Fibrin glue* merupakan substansi adesif *biocompatible* yang digunakan di dunia pembedahan dan kedokteran. Substansi ini terdiri dari 2 komponen utama, yaitu fibrinogen dan trombin. Saat kedua komponen ini tercampur, akan terbentuk substansi mirip gel yang menyerupai proses pembekuan darah alamiah tubuh. *Fibrin glue* telah digunakan sebagai produk laboratorium atau bank darah di Amerika Serikat sejak tahun 1980-an, dan walaupun sempat tertunda akhirnya disetujui oleh FDA dan tersedia secara komersial sejak tahun 1998 (Spotnitz, 2010).

Semula ahli bedah menggunakan bahan material berbasis rumah sakit karena kekurangan ketersediaan bahan yang diproduksi secara komersial. Saat ini, ada lima jenis yang disetujui Badan Pengawas Obat dan Makanan Amerika Serikat (FDA), termasuk



produk yang berasal dari plasma manusia (*pooled* atau *autologous*), serta plasma *bovine*. Indikasi on-label ini meliputi hemostatik, *colonic sealing*, dan perlekatan cangkok kulit. Penggunaan klinis dan eksperimental saat ini meliputi perlekatan jaringan atau *mesh attachment*, penutupan fistula, *lymphatic sealing*, pencegahan *adhesi*, *drug delivery*, dan rekayasa jaringan (Spotnitz, 2010). *Fibrin glue* bersifat biodegradasi, non-inflamasi, fleksibel dan non-toksik. Sifatnya yang non-bakteriostatik menyebabkan penggunaannya sebagai transporter antibiotik di dalam sistem penghantaran obat (*drug delivery*) (Zhang, 2021).

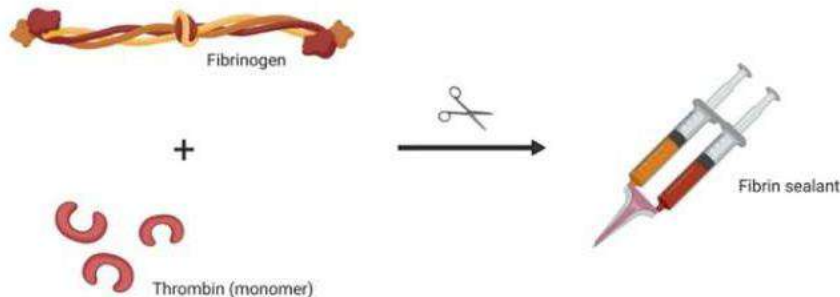
Komponen *fibrin glue* terdiri atas fibrinogen, trombin, faktor XIII, kalsium, dan aprotinin. Trombin mengaktifkan jalur koagulasi dengan mengkonversi fibrinogen menjadi fibrin yang akhirnya akan membentuk *fibrin clot*. Faktor XIII dan kalsium juga berperan di jalur ini. Aprotinin menghambat fibrinolisis, yang akan mempertahankan bentuk fibrin yang stabil. Mekanisme aksi komponen *fibrin glue* ditunjukkan di dalam **Gambar 2** (kotak berwarna hijau) (Win *et al.*, 2021).



**Gambar 2.** Mekanisme kerja komponen yang terlibat dalam *fibrin glue* (Win *et al.*, 2021).

Aplikasi klinis *fibrin glue* juga diterapkan dalam manajemen tata laksana penyakit pilonidal, suatu penyakit erosi yang rekuren pada folikel rambut di area *natal cleft*, yaitu mulai teknik invasif minimal hingga metode pembedahan. Aplikasi *fibrin glue* pada penyakit ini merupakan salah satu metode tambahan *non-traumatic* yang diterapkan setelah prosedur pembedahan berupa eksisi *sinus tract* yang diikuti dengan teknik penutupan dan flap primer atau sekunder. Metode yang terbaik adalah dengan

mempertimbangkan aspek penyembuhan yang lebih cepat, sedikit komplikasi, dan rekuren yang minimal (Win *et al.*, 2021).

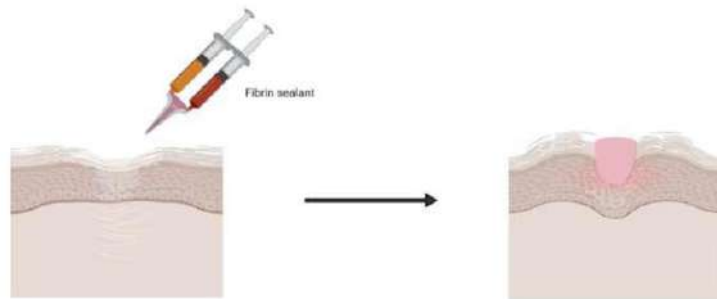


**Gambar 3.** Komposisi *fibrin sealant* terdiri dari fibrinogen dan trombin (Zhang, 2021).

Aspek penting yang perlu dipertimbangkan dalam aplikasi klinis *fibrin glue* adalah sebagai berikut: (1) *fibrin glue* berperan penting dalam menghentikan perdarahan selama pembedahan (hemostasis). Contoh prosedur pembedahan tersebut termasuk pembedahan kardiovaskuler, bedah saraf, dan liver dimana fibrin glue diterapkan untuk menutup pembuluh darah dan jaringan; (2) *fibrin glue* digunakan untuk perlekatan jaringan, penutupan luka, memperkuat jahitan, dan mencetuskan penyembuhan jaringan terutama di area sensitif ataupun yang sulit terjangkau; (3) *fibrin glue* dapat ditoleransi dengan baik oleh tubuh (biokompatibilitas), memiliki kemiripan dengan mekanisme pembekuan darah dalam tubuh yang alami sehingga menurunkan resiko terjadinya efek samping, maupun reaksi alergi (Spotnitz, 2010).

*Fibrin glue* merupakan salah satu *tissue adhesive* paling awal. Substansi ini memiliki berbagai aplikasi tidak hanya dalam pembedahan dan laboratorium, tetapi juga di bidang *drug delivery*. Hal terpenting bahwa *fibrin glue* merupakan satu-satunya agent hemostatik, *sealant* dan *adhesive* yang disetujui oleh FDA untuk aplikasi klinisnya. *Fibrin tissue adhesive* memiliki keunggulan dalam hal biodegradabilitasnya, tidak toksik, serta memiliki kemampuan mengendalikan pendarahan yang sangat baik dibandingkan dengan *non-fibrin tissue adhesive* (Zhang, 2021).

*Fibrin glue* memiliki keterbatasan karena kekuatan perlekatan yang tidak sekuat jahitan (suture) ataupun staples pada luka yg lebar. Jika hal ini terjadi maka biaya penggunaan *fibrin glue* akan lebih mahal dibandingkan metode penutupan yang lain.



**Gambar 4.** Penggunaan *fibrin sealant* untuk penyembuhan luka (Zhang, 2021).

#### **4.2.LEGAL ISSUE FIBRIN GLUE**

Fibrin glue dapat dibuat dari *pooled plasma*, misalnya *fibrin sealant* yang tersedia secara komersial, atau dari *single-donor plasma*. Teknik isolasi (contohnya, kriopresipitasi dan presipitasi etanol), variabilitas *batch*, dan komposisi (misalnya, konsentrasi trombin, fibrinogen, faktor XIII, dan antifibrolitik) menyebabkan sifat mekanik dan biologis yang berbeda pada klot yang dihasilkan (Noori *et al.*, 2017).

*Fibrin glue* yang paling umum digunakan terbuat dari *allogenic human pooled plasma* yang berasal dari banyak donor. Meskipun pasteurisasi dan teknologi pencegahan infeksi lainnya secara rutin dilakukan, masih terdapat kemungkinan terjadi infeksi virus yaitu human parvovirus (HPV) B19 dan hepatitis. Penggunaan *allogenic fibrin glue* dapat menyebabkan anafilaksis karena penambahan *bovine aprotinin* (molekul antifibrolitik) untuk stabilisasi bekuan darah. Pencegahan resiko terkait dengan *allogenic fibrin glue* ini dapat menggunakan *autologous fibrin glue* sebagai alternatif yang layak untuk mengurangi resiko infeksi dan reaksi alergi (Kawashima *et al.*, 2020).

### **5. KESIMPULAN**

Efektivitas penggunaan PRP dapat bervariasi dari satu pasien ke pasien lainnya, sehingga diperlukan lebih banyak penelitian untuk menetapkan protokol standar dan menentukan manfaat jangka panjangnya.

*Platelet-rich* fibrin memiliki kelebihan dalam hal regenerasi dan penyembuhan jaringan di berbagai kasus medis dan kedokteran gigi. Namun diperlukan riset lebih lanjut untuk menentukan penggunaan yang optimal dan kelebihannya di berbagai kasus pasien. Meskipun demikian, aplikasi klinis PRF mewakili bidang pengembangan yang menarik dalam kedokteran regeneratif.

*Fibrin glue* merupakan salah satu substansi yang bermanfaat dalam dunia kedokteran modern, yang memiliki kelebihan di aspek hemostatik, *sealant* dan *adhesive* jaringan terutama pada prosedur pembedahan yang sulit.

## DAFTAR PUSTAKA

Anonym (2019) *Platelet-rich fibrin, Implants Pro Center*. Available at: <https://implantsprocentersanfrancisco.com/platelet-rich-fibrin-prf-use-advantages-disadvantages-working-applications/> (Accessed: October 3, 2023).

Cao, Y. *et al.* (2021) “A narrative review of the research progress and clinical application of platelet-rich plasma,” *Annals of palliative medicine*, 10(4), pp. 4823–4829. doi: 10.21037/apm-20-2223.

Dawood, A. S. and Salem, H. A. (2018) “Current clinical applications of platelet-rich plasma in various gynecological disorders: An appraisal of theory and practice.,” *Clinical and experimental reproductive medicine*, 45(2), pp. 67–74. doi: 10.5653/cerm.2018.45.2.67.

Greco, A. F. *et al.* (2019) “Platelet-Rich Fibrin and its Emerging Therapeutic Benefits for Musculoskeletal Injury Treatment.,” *Medicina (Kaunas, Lithuania)*, 55(5). doi: 10.3390/medicina55050141.

Kawashima, M. *et al.* (2020) “Feasibility of autologous fibrin glue in general thoracic surgery,” *Journal of Thoracic Disease*, 12(3), pp. 484–492. doi: 10.21037/jtd.2020.01.01.

Medicine, J. H. (2023) *Platelet-Rich Plasma (PRP) Injections, The Johns Hopkins University*. Available at: <https://www.hopkinsmedicine.org/health/treatment-tests-and-therapies/plateletrich-plasma-prp-treatment> (Accessed: October 2, 2023).

Naik, B. *et al.* (2013) “Role of Platelet rich fibrin in wound healing: A critical review.,” *Journal of conservative dentistry: JCD*, 16(4), pp. 284–293. doi: 10.4103/0972-0707.114344.

Noori, A. *et al.* (2017) “A review of fibrin and fibrin composites for bone tissue engineering.,” *International journal of nanomedicine*, 12, pp. 4937–4961. doi: 10.2147/IJN.S124671.

Spotnitz, W. D. (2010) “Fibrin sealant: past, present, and future: a brief review.,” *World journal of surgery*, 34(4), pp. 632–634. doi: 10.1007/s00268-009-0252-7.

Win, M. *et al.* (2021) “A Systematic Review of Fibrin Glue as an Ideal Treatment for the Pilonidal Disease.,” *Cureus*, 13(8), p. e16831. doi: 10.7759/cureus.16831.

Yaman, R. and Kinard, T. N. (2022) “Platelet rich plasma: hope or hype?,” *Annals of Blood*, 7, pp. 1–7. doi: 10.21037/AOB-21-57.

Zhang, Y. (2021) “Applications of fibrin tissue sealant,” *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 632(5), pp. 1–12. doi: 10.1088/1755-1315/632/5/052098.

Zumarán, C. C. *et al.* (2018) “The 3 R’s for platelet-rich fibrin: A ‘super’ tri-dimensional biomaterial for contemporary naturally-guided oro-maxillo-facial soft and hard tissue repair, reconstruction and regeneration,” *Materials*, 11(8). doi: 10.3390/ma11081293.

## 2.2 PROSEDUR PEMBUATAN BERBAGAI BAHAN OTOLOGUS

Delita Prihatni  
Instalasi Laboratorium Klinik  
KSM /Departemen/Patologi Klinik  
RS Dr. Hasan Sadikin/FK Universitas Padjadjaran

Beberapa jenis bahan otologus yang dapat digunakan untuk membantu proses penyembuhan luka

### 1. PEMBUATAN SERUM OTOLOGUS

Serum otologus adalah tetes mata serum otologus yang dibuat dari serum pasien sendiri, yang masih dapat memiliki komponen seperti *epidermal growth factor*, fibronectin dan vitamin E yang tidak didapatkan pada tetes mata buatan komersial.

#### Prinsip

Serum pasien digunakan untuk tetes mata pasien yang sama

#### Tujuan/Manfaat

Untuk membuat tetes mata serum otologus

#### Alat dan Bahan

1. Tourniquet
2. Kapas alkohol
3. Sarung tangan
4. Jarum *vacutainer*
5. Rak tabung
6. Sentrifus
7. Spuit 3 ml
8. 4 buah botol tetes mata steril

#### Prosedur

1. Pasien diambil darah vena sebanyak 20 ml atau 5 buah tabung *vacutainer* 4 ml.
2. Pengambilan darah dilakukan sesuai dengan prosedur pengambilan darah vena menggunakan *vacutainer*.

3. Tabung *vacutainer* yang berisi darah diletakan pada rak tabung dan biarkan darah membeku pada suhu kamar selama 30-45 menit.
4. Darah disentrifus dengan kecepatan 3000 rpm selama 10 menit.
5. Disiapkan botol tetes mata steril yang telah diberi identitas pasien.
6. Diambil serum sebanyak 1.25 ml dengan menggunakan spuit steril.
7. Serum dimasukan ke dalam botol tetes mata, sedikit demi sedikit.
8. Sebelum ditutup bersihkan dengan alkohol 70 %.

Lakukan untuk botol berikutnya

#### **Penyimpanan serum :**

1. Simpanlah serum yang sudah ditempatkan pada botol tetes mata di lemari pendingin 4<sup>0</sup>C atau -20<sup>0</sup>C.
2. Pada suhu 4<sup>0</sup>C serum dapat bertahan selama 1 bulan pada suhu -20<sup>0</sup>C dapat bertahan selama 3 bulan.
3. Botol serum yang sudah dibuka digunakan tidak lebih dari satu minggu.

#### **Prosedur penyerahan serum kepada pasien :**

1. Botol serum diberi identitas pasien, dan botol diusahakan tidak terkena sinar matahari langsung.
2. Botol serum yang diserahkan kepada pasien dimasukkan ke dalam wadah (dapat berupa termos es atau plastik yang diisi dengan es batu)

#### **Pustaka acuan**

Kojima T, Higuchi A, Goto E et al: Autologous serum eye drops for treatment of dry eye disease. *Cornea*. 2008 Sep;27 Suppl 1:S25-30

## **2. PEMBUATAN PLATELET RICH PLASMA (PRP)**

*Plasma Rich Plasma* adalah plasma darah yang diperoleh dari darah sitrat yang mengandung 1.000.000 trombosit/mikroliter dengan volume 5 mL plasma, dan memiliki konsentrasi faktor pertumbuhan sebanyak 3-5 kali lebih tinggi dari nilai normal.

#### **Tujuan/ Manfaat**

Untuk mendapatkan PRP kualitas baik dengan kandungan *growth factor* tinggi yang dapat digunakan untuk terapi klinis dalam perbaikan lesi dan proses regenerasi.

## Alat dan Bahan

Darah vena dengan antikoagulan Natrium sitrat 3,2% (20-60 cc)

1. Sarung tangan
2. Centrifuge
3. Tabung centrifuge
4. Peralatan flebotomi (sarung tangan, kapas alkohol, jarum *vacutainer*, tabung *vacutainer*, tourniquet)

## Prosedur

1. *Whole blood* (20-60 ml) dikumpulkan dalam beberapa tabung 0,109M (3,2%) antikoagulan trisodium sitrat (1 vol).
2. Sentrifugasi pertama pada kecepatan 100-200g selama 10-15 menit pada suhu kamar. Hasil sentrifugasi pertama didapatkan lapisan paling atas adalah PPP (*platelet poor plasma*), lapisan tengah berupa *buffy coat* (platelet & WBC), dan lapisan dasar berisi eritrosit
3. Diambil 1/2-2/3 bagian PPP, dipindahkan pada tabung centrifuge steril
4. Dilakukan sentrifugasi kedua pada kecepatan 400g selama 10-15 menit pada suhu kamar.
5. Diambil 1/2 volume bagian atas (PPP) lalu dibuang untuk mendapatkan lapisan bawah yaitu plasma yang terkonsentrasi dengan platelet dan leukosit.

## Pustaka Acuan

Amanda G. M. Perez, José Fábio S. D. Lana, Ana Amélia Rodrigues, Angela Cristina M. Luzo, William D. Belangero, Santana aMHA. Relevant Aspects of Centrifugation Step in the Preparation of Platelet-Rich Plasma. ISRN Hematology. 2014;2014:1-8.

## 3.PEMBUATAN *FIBRIN GLUE*

*Fibrin glue* merupakan formulasi lem yang digunakan untuk membentuk fibrin clot, yang memiliki dua bahan utama, fibrinogen (protein) dan trombin (enzim) yang dimurnikan

## Prinsip



Bila larutan fibrinogen ditambahkan dengan larutan thrombin, maka akan terbentuk benang-benang fibrin yang mempunyai sifat menyerupai lem

### **Tujuan/manfaat**

Untuk membuat lem fibrin otologus

### **Bahan Pemeriksaan**

1. 5 ml darah dengan antikoagulan sitrat
2. 3 ml darah dengan antikoagulan heparin

### **Reagen**

1. Aquabidestilata
2. Asam asetat 1% (harus baru)
3. NaCl fisiologis
4.  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  0.1 M
5.  $\text{CaCl}_2$  0.1 M

### **Alat dan Bahan**

1. *Minitube* 1 ml
2. Tabung sentrifus plastik/konikal berskala 10 ml
3. Sentrifus
4. pH meter/pH *universal indicator*
5. Waterbath
6. Sduit 1 ml
7. Tips kuning, tips biru
8. Parafilm

### **Prosedur**

#### **A. Pembuatan Larutan Fibrinogen**

1. Sebanyak 3 ml darah vena dimasukkan dalam tabung heparin.
2. Sentrifus dengan kecepatan 3000 rpm selama 10 menit.
3. Pisahkan plasma dengan menggunakan pipet otomatis dan masukan dalam *minitube* (ini merupakan larutan fibrinogen).
4. Simpan plasma pada suhu  $-4^{\circ}\text{C}$  minimal 1 jam

#### **B. Pembuatan Larutan Trombin**

1. Sebanyak 5 ml darah sitrat disentrifus dengan kecepatan 3000 rpm selama 10 menit.

2. Pisahkan plasma dan masukan dalam 2 tabung sentrifus plastik.
3. Plasma diencerkan dengan menggunakan aquabidestilata hingga volume 10 ml.
4. Titrasi dengan menggunakan asam asetat 1 % (tetes demi tetes) hingga mencapai pH 5.3 (titrasi dapat menggunakan spuit 1 ml).
5. Homogenkan plasma dan biarkan selama 1 jam hingga terbentuk presipitat.
6. Sentrifus kembali dengan kecepatan 3000 rpm selama 5 menit.
7. Terbentuk presipitat dan supernatant, lalu supernatan dibuang.
8. Larutkan kembali presipitat dengan menambah NaCl fisiologis sampai garis 1 ml
9. Setelah dicampur lalu divortex sampai homogen.
10. Satukan kedua larutan tersebut
11. Titrasi larutan dengan  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  0.1 M hingga pH 7 (tetes demi tetes, dapat menggunakan spuit 1 ml).
12. Tabung yang berisi larutan diinkubasi dalam *waterbath* suhu  $37^\circ\text{C}$  selama 2 menit.
13. Ditambahkan  $50\ \mu\text{L}$   $\text{CaCl}_2$  0.1 M, kemudian *stopwatch* dijalankan.
14. Buang gumpalan yang terbentuk dalam waktu 45-120 detik (2 menit).
15. Larutan jernih yang tersisa dimasukan dalam *minitube*
16. Kemudian disimpan pada suhu  $4^\circ\text{C}$  minimal 1 jam

#### **Cara Membuat Reagen:**

- a. Asam asetat 1%:  $50\ \mu\text{L}$  asam asetat pekat diencerkan dengan  $4950\ \mu\text{L}$  aquades (harus dibuat baru).
- b.  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  0.1 M: Ditimbang  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  1.06gram dilarutkan dengan aquades 100 ml (stabil selama satu tahun).
- c.  $\text{CaCl}_2$  0.1 M: Ditimbang 1.47gram  $\text{CaCl}_2$  dilarutkan dengan aquades 100 ml (stabil selama satu tahun).

#### **Pustaka Acuan**

Spotnitz W. Fibrin Sealant: Past, Present, and Future: a Brief Review. World Journal of Surgery. 2010, 34: 632–634

#### 4. PEMBUATAN *BIO PLATELET RICH FIBRIN (PRF)*

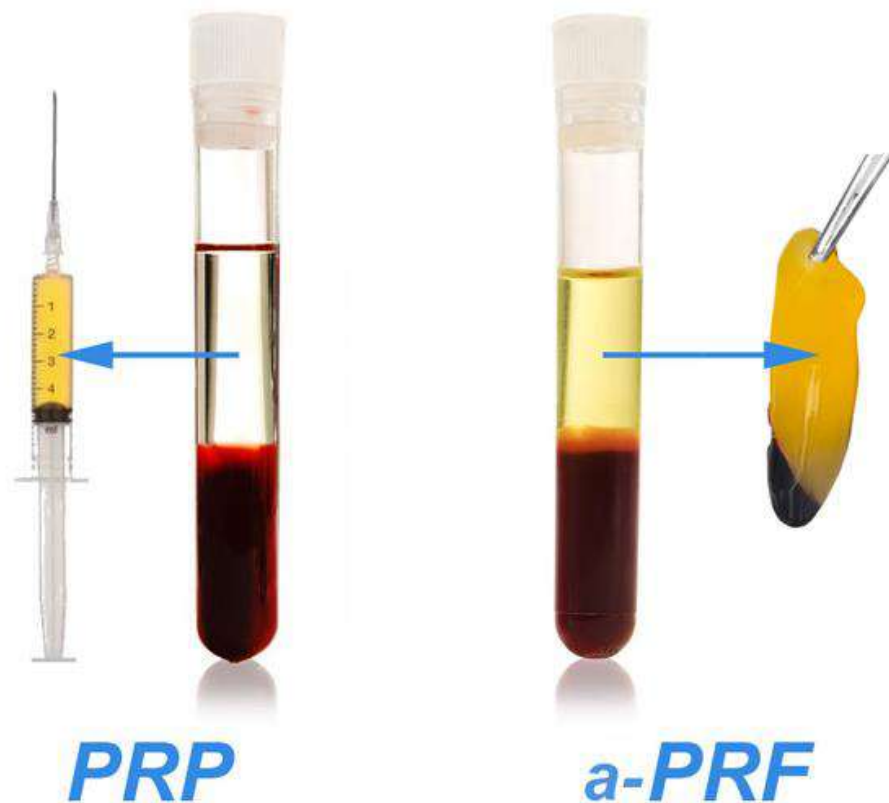
Merupakan biomaterial fibrin yang kaya akan trombosit dan leukosit autologus, yang bertujuan untuk mengakumulasi trombosit, promotor sistem imunitas, dan melepaskan sitokin dalam bekuan fibrin.

##### **Tujuan/manfaat**

Membantu proses penyembuhan luka dan mencegah infeksi

##### **Prosedur**

1. Ambil darah vena sebanyak 10 ml
2. Masukkan ke dalam tabung plain
3. Sebelum 5 menit segera lakukan sentrifuse 7G selama 8 menit
4. Serahkan pada operator/petugas
5. Ambil gumpalan fibrin yang terbentuk



<https://www.my-smile.gr/en/a-prf-3/>

## **Pustaka acuan**

1. <https://www.my-smile.gr/en/a-prf-3/>, diunduh 1 Okt
2. APavlovic V, Ciric M, Jovanovic V, Trendafilovic M, Stojanovic P, 2021. Platelet-rich fibrin: Basics of biological actions and protocol modifications. *Open Medicine* 16: 446–454
3. Rachel Lee, Ph.D. Laboratory Design QA/QC Considerations. Texas Department of State Health Services. March 12<sup>th</sup> 2015
4. WHO LQMS - Information on Laboratory Design.  
<https://extranet.who.int/lqsi/sites/default/files/attachedfiles/LQMS%20-2%20to%20-4%20Laboratory%20design.pdf>
5. WHO. Laboratory design and maintenance. Laboratory biosafety manual and associated monographs, 4th edition.  
<https://www.who.int/publications/i/item/9789240011397>

# BAB 3

## MOLEUCULER LABORATORY SET UP

### 3.1. MANAGEMEN BIORISIKO

**Merci Monica Pasaribu**  
**Departemen Patologi Klinik FKUI-RSCM**

---

---

#### 1. PENDAHULUAN

Laboratorium memiliki kemungkinan sebagai risiko penularan bagi pekerja maupun lingkungan sekitarnya. Sejarah mencatat perkembangan manajemen biorisiko salah satunya dimulai saat eradikasi *smallpox* di dunia. Suatu laboratorium penelitian di Inggris menjadi pusat diagnostik dan penelitian. Pada saat itu ditemukan pasien yang terinfeksi merupakan varian virus *smallpox* yang bersumber dari laboratorium. Tercatat 80 orang terinfeksi, salah satunya adalah seorang petugas laboratorium yang akhirnya meninggal dunia. Kejadian lainnya adalah seorang fotografer medik yang bekerja 1 lantai diatas ruang laboratorium mengalami infeksi dan akhirnya meninggal dunia. Upaya penyembuhan dan karantina terhadap orang yang berkontak dengan petugas laboratorium dan fotografer tersebut membutuhkan waktu yang panjang. World Health Organization (WHO) menyatakan bahwa laboratorium mikrobiologi tersebut fasilitasnya tidak mengikuti standar WHO. Biaya yang dikeluarkan akibat infeksi kebocoran laboratorium tersebut adalah 23 juta dollar Amerika Serikat per tahun. Hal tersebut mendasari dibuatnya panduan *Laboratory Biosafety Manual* oleh WHO pada tahun 1983.<sup>1</sup> Biosafety laboratorium menggambarkan prinsip, teknologi, dan langkah *containment* (pembatasan) untuk mencegah paparan terhadap patogen dan toksin secara tidak sengaja atau akibat kecelakaan.<sup>2</sup>

Perkembangan panduan *biosafety* laboratorium seiring dengan *biosecurity*. WHO menetapkan keamanan laboratorium menjadi hal penting terutama material biologik berharga. *Biosecurity* laboratorium menggambarkan upaya proteksi, pengendalian, dan akuntabilitas terhadap material biologik berharga (Valueable Biological Material=VBM) untuk mencegah terjadinya masuk laboratorium tanpa ijin, kehilangan, pencurian, penggunaan yang salah, penyimpangan penggunaan dan terlepas tanpa sengaja.<sup>2,3</sup>

Organisasi yang terlibat dalam penanganan agen biologik dan toksin harus memiliki prosedur yang aman dan terjaga.<sup>1</sup>

Laboratorium medik seyogyanya memiliki sistem manajemen biorisiko yang bertujuan tercapai *biosafety* dan *biosecurity*. Sistem tersebut dibuat atau diadaptasi sesuai keunikan prosedur dan risiko setiap laboratorium.<sup>1,2</sup> WHO menetapkan definisi manajemen biorisiko yaitu analisis terhadap upaya dan pengembangan strategis untuk meminimalkan kemungkinan terjadinya biorisiko, sedangkan sistem manajemen biorisiko adalah bagian dari sistem manajemen pada suatu organisasi untuk mengembangkan dan menerapkan kebijakan dan pengelolaan biorisiko yang ada. Biorisiko sendiri didefinisikan oleh WHO sebagai kombinasi kemungkinan kejadian bahaya dan derajat keparahannya yang bersumber dari agen biologik atau toxin. Sumber bahaya tersebut dapat timbul akibat paparan tanpa sengaja, hilang atau terlepas akibat kecelakaan, pencurian, salah penggunaan, penyimpangan, masuk tanpa ijin atau masuk tanpa ijin dengan paksaan. Tujuan ditetapkannya manajemen biorisiko sesuai dengan visi WHO yaitu “*Safe and secure environment in and around every laboraty in the world*”. Panduan sistem manajemen biorisiko yang akan ditetapkan oleh setiap laboratorium dapat mengacu pada standar WHO atau standar lain. Beberapa negara di eropa umumnya mengikuti panduan CEN Workshop Agreement (CWA) 157937 yang sebenarnya mengacu juga pada standar WHO”.<sup>2</sup>

Lestari dkk.<sup>4</sup> melaporkan 8 laboratorium klinik dan penelitian telah menerapkan manajemen risiko tetapi memerlukan perbaikan kepemimpinan, penyediaan, evaluasi performa dan operasional.<sup>4</sup> Aroem dkk.<sup>5</sup> melaporkan 50 laboratorium penelitian di Universitas Indonesia masih memiliki kekurangan dalam implementasi manajemen biorisiko.<sup>5</sup> Appelt dkk.<sup>6</sup> melaporkan manajemen biorisiko pada laboratorium *containment* level tinggi telah dilakukan pada 18 negara di Eropa.<sup>6</sup> Berbagai institusi, organisasi dan negara berupaya untuk mengembangkan sistem manajemen biorisiko.<sup>7</sup>

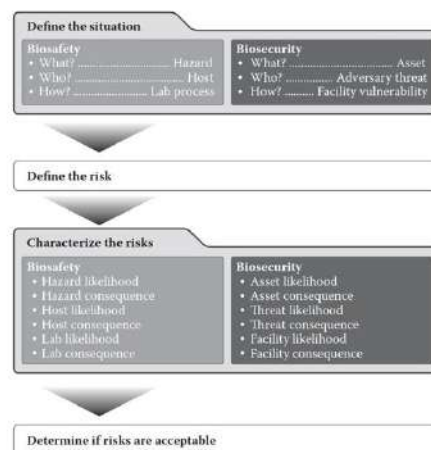
Manajemen biorisiko dapat dibagi menjadi 3 komponen yaitu *assessment*, *mitigation*, *performance*. Pada makalah ini akan dibahas mengenai manajemen biorisiko yang meliputi risk assesment dan pelaporannya, implementasi, dan evaluasi

## **ASSESMEN RISIKO**

Sistem manajemen risiko dimulai dengan *assessment* risiko. Assesment risiko adalah penilaian baik kuantitatif dan kualitatif terhadap akan akan timbulnya sesuatu

yang buruk atau tidak menyenangkan. *Assesment* dilakukan sebelum memulai bekerja. Risiko biologik dapat berubah setiap saat, oleh sebab itu review terhadap *assessment* setidaknya setahun sekali. Hal-hal yang dapat menyebabkan perubahan risiko biologik antara lain adalah ada agen infeksi baru, toksin, reagen atau substansi yang berbahaya, prosedur baru, alat baru, perubahan personal, perubahan pada manufaktur atau suplai terhadap materi *consumable* (PPE, container, tempat penampung limbah), peralatan yang sudah tidak dapat beroperasi secara efektif, kemajuan ilmu pengetahuan, renovasi, relokasi, kecelakaan, *laboratory-acquired infection* (LAI), pencurian, atau kekerasan keamanan. *Assesment* risiko melibatkan seluruh organisasi mulai dari pimpinan tertinggi sampai pelaksana terbawah, yaitu kepala laboratorium, peneliti utama, asisten peneliti, petugas *Biosafety*, dokter spesialis yang bekerja di laboratorium, dan komite *Biosafety* pada institusi tersebut.<sup>1</sup>

Risiko biosafety adalah risiko biologik yang dapat berefek pada manusia, hewan dan lingkungan setelah terpapar tidak sengaja atau terlepas dari agen biologik. Risiko *biosecurity* adalah risiko yang merupakan akibat dari seseorang berniat tidak baik dan memiliki akses terhadap material atau fasilitas berbahaya. Langkah yang dilakukan dalam menetapkan risiko *biosafety* dan *biosecurity*.<sup>1,2</sup>



**Gambar 1. Langkah assessment risiko<sup>1</sup>**

Gambar 1 memperlihatkan pada tahap awal assessment pada elemen *biosafety* dan *biosecurity* adalah menentukan situasi. Langkah ini dimulai dengan pertanyaan apa bahaya yang akan timbul, siapa yang akan terkena dampak mulai dari yang ada di dalam laboratorium sampai keluar laboratorium, serta menentukan lokasi aktivitas dan peralatan laboratorium yang digunakan. Pada elemen *biosecurity* dimulai dengan mengidentifikasi

apa saja aset yang dimiliki yang harus dilindungi sebagai contoh adalah generator listrik sebagai cadangan saat terjadi pemadaman listrik. Aset lain antara lain material biologik berharga yaitu patogen atau toksin, peralatan berharga, hasil karya intelektual, informasi sensitif, reagen, dan laboratorium hewan. Pertanyaan berikutnya adalah menentukan ancaman meliputi kemampuan, motif, keuntungan, dan peluang. Penilaian berikutnya adalah menentukan keamanan fasilitas dan laboratorium, perlu dinilai siapa saja yang mendapatkan akses masuk ke suatu laboratorium.<sup>1</sup>

Tahap selanjutnya pada elemen *biosafety* adalah menentukan risiko meliputi bahaya, host, dan aktivitas kerja. Penentuan risiko termasuk menilai bahaya terpaparnya orang yang berada di laboratorium dan diluar laboratorium, sebagai contoh risiko individu di dalam laboratorium maupun diluar laboratorium terhadap infeksi dengan transmisi droplet, bersentuhan, mukosa, atau gastrointestinal. Penentuan risiko pada *biosecurity* meliputi risiko pencurian material biologik berharga untuk kepentingan pribadi maupun kejahatan, pencurian peralatan, kekayaan intelektual, informasi berharga.<sup>1</sup>

Langkah selanjutnya adalah menilai risiko dapat diterima, dikontrol atau tidak diterima. Pada tahap ini alat bantu yang dapat digunakan adalah matriks *assesment* risiko yang menilai kecenderungan terulangnya kejadian dan dampaknya. Gambar 2 memperlihatkan matriks assesment risiko, semakin sering dan dampak berbahaya maka akan berwarna merah.<sup>8</sup>

		Likelihood of exposure/release				
		Rare	Unlikely	Possible	Likely	Almost certain
Consequences of exposure/ release	Severe	Medium	Medium	High	Very high	Very high
	Major	Medium	Medium	High	High	Very high
	Moderate	Low	Low	Medium	High	High
	Minor	Very low	Low	Low	Medium	Medium
	Negligible	Very low	Very low	Low	Medium	Medium

**Gambar 2. Matriks Penilaian Risiko<sup>8</sup>**

Mitigasi biorisiko merupakan komponen fundamental kedua terdiri dari aksi dan kontrol. Assesment risiko sangat penting dalam mengambil tindakan mitigasi, banyak laboratorium melakukan aksi dan kontrol yang sangat tidak efektif dalam mengurangi atau mengeliminasi risiko tertentu karena assesment risiko tidak selesai dikerjakan atau



selesai tapi tidak lengkap, sebagai contoh pemakaian sarung tangan Class III yang mahal. Kontrol mitigasi membantu menilai mitigasi dari paling efektif sampai tidak efektif. Setelah assessment risiko dilakukan maka secara teknik akan memudahkan penentuan orang yang tepat yang bekerja pada laboratorium tersebut, memilih level *containment* yang tepat, peralatan protektif yang tepat, prosedur yang tepat. Assessment risiko juga memiliki peran untuk manajemen yaitu dapat memilih training yang tepat, mengukur kemampuan laboratorium, mengetahui kebutuhan biosekuriti, dan mengikuti panduan yang berlaku.<sup>1</sup>

Panduan WHO format pelaporan assesment risiko dapat dijadikan acuan. Pada panduan tersebut ada format pelaporan singkat dan panjang. Pada kedua format tampak dibagian awal adalah identitas dari Laboratorium, nama manager atau penyelia, judul prosedur yang akan dinilai dan tanggal. Pada bagian berikutnya merupakan langkah awal yaitu identifikasi bahaya, diikuti dengan penilaian risiko, strategi untuk melakukan kontrol terhadap risiko, implementasi kontrol risiko dan evaluasi. WHO memberikan contoh laporan assesment risiko seperti pada Gambar 3 sampai 7.<sup>8</sup>

### TEMPLATE: MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS TESTING

**STEP 1. Gather information (hazard identification)**

**Instructions:** Provide a brief overview of the laboratory work and summarize the laboratory activities to be conducted that are included in the scope of this risk assessment.

Describe the biological agents and other potential hazards (for example, transmission, infectious dose, treatment/prevention measures, pathogenicity).

- All *M. tuberculosis* may be present in clinical specimens (sputum, urine, other body fluids or infected tissues)
- Spread by airborne and percutaneous routes, ingestion, contact/fomites
- M. tuberculosis* (infectious dose) is estimated to be < 10 bacilli
- Highly transmissible
- Effective immunization is not routinely available
- Antibiotics are available for post-exposure prophylaxis
- Multidrug-resistant tuberculosis (MDR-TB) and extensively drug-resistant TB (XDR-TB) strains exist but are not likely in this setting
- Susceptible to 5600 ppm hypochlorite, 10 minutes exposure time and autoclave at 121 °C for 15 minutes

**STEP 1. Gather information (hazard identification) (continued)**

**Instructions:** Provide a brief overview of the laboratory work and summarize the laboratory activities to be conducted that are included in the scope of this risk assessment.

Describe the laboratory procedures to be used (for example, culturing, centrifugation, work with sharps, waste handling, frequency of performing the laboratory activity).

- Specimen receipt and recording
- Direct smear microscopy to detect acid-fast bacilli
- Autoclaving and disposal of waste (by external contractor)
- Cleaning of laboratory after any spills
- PPE: laboratory coats, latex gloves
- Equipment: refrigerator, heat block/flame, microscope, broken glass/sharps containers, autoclave (validated annually)

Describe the type of equipment to be used (personal protective equipment (PPE), centrifuges, autoclaves, biological safety cabinets (BSCs)).

Describe the type and condition of the facility where work is conducted.

The microbiology laboratory is a room next to the patient waiting area and specimen collection/physiology rooms. It is an older facility with some cracked vinyl tiles on the floor, open screened windows and open doors that can be closed at the end of the work shift. Bench tops are impervious to disinfectants; however there are some cracks in the surface. All furniture is sturdy and able to be disinfected. Electric and water supply is adequate for laboratory work but there is only one sink that is used for staining and hand washing.

Describe relevant human factors (for example, competency, training, experience and attitude of personnel).

Personnel are trained on laboratory biosecurity and compliance is generally good among senior personnel. Personnel turn-over, especially of the younger colleagues, is high. New personnel require mentorship but adequate supervision is not always available. Job aides with photographs are posted to remind personnel of laboratory and safety procedures.

Describe any other factors that may affect laboratory operations (for example, legal, cultural, socioeconomic).

There is occasional crime in the area (for example, burglary), but it is usually of computer and office supplies and the laboratory or patient rooms have never been affected.

Gambar 3. Contoh laporan assesment risiko langkah 1

**STEP 2. Evaluate the risks**

**Instructions:** Describe the how exposure and/or release could occur.

What potential situations are there in which exposure or release could occur?

- Aerial exposure to or release of *M. tuberculosis* from a spill
- Contact with contaminated surfaces
- Improperly treated waste

What is the likelihood of an exposure/release occurring (unlikely, possible, likely)?

- Aerial exposure to or release of *M. tuberculosis* from a spill – possible
- Contact with contaminated surfaces – possible
- Improperly treated waste – possible

What is the severity of the consequences of an exposure/release (negligible, moderate, severe)?

None

**Instructions:** Evaluate the risk and prioritize the implementation of risk control measures. Circle the initial risk of the laboratory activities including risk control measures described in STEP 1 but follow any additional risk control measures have been put in place.

**Note:**

- When assigning priority, other factors may need to be considered, for example, urgency, feasibility/sustainability of risk control measures, delivery and installation time and training availability.
- To estimate the overall risk, take into consideration the risk ratings for the individual laboratory activities/procedures, separately or collectively as appropriate for the laboratory.

		Likelihood of exposure/release		
		Unlikely	Possible	Likely
Consequences of exposure/release	Severe	Medium	High	Very high
	Moderate	Low	Medium	High
	Negligible	Very low	Low	Medium

**STEP 2. Evaluate the risks (continued)**

Laboratory activity/procedure	Initial risk (very low, low, medium, high, very high)	Is the initial risk acceptable? (yes/no)	Priority (high/medium/low)
Spill of patient specimens with production of aerosols	Medium	No	High
Spill of or contamination from patient specimens	High	No	High
Sharps injury from handling glass slides	Low	Yes	Low
Exposure to improperly treated waste	Medium	No	Medium
Select the overall initial risk.	<input checked="" type="checkbox"/> Very low <input type="checkbox"/> Low <input type="checkbox"/> Medium <input type="checkbox"/> High <input type="checkbox"/> Very high		
Should work proceed without additional risk control measures?		Yes <input type="checkbox"/> No <input checked="" type="checkbox"/>	

**Gambar 4. Contoh laporan assesment risiko langkah 2**

**STEP 3. Develop a risk control strategy**

Instructions: Describe the resources available for risk control and consider their applicability, availability and sustainability in the local context including management support.

Are resources sufficient to secure and maintain potential risk control measures?	Yes, PPE is provided and readily available but additional PPE, such as respiratory protection, is not available.
Describe the measures advised by guidelines, policies and strategies (if any).	Limited financial resources are available to buy any additional PPE or safety equipment.
Will work be able to proceed without any of the risk control measures; are there alternatives?	Unknown; if liquid culture or antibiotic sensitivity testing needs to be done, or if MDR-TB or XDR-TB were present, additional PPE and safety equipment may need to be procured or specimens will have to be sent to another laboratory for confirmatory testing.

**Gambar 5. Contoh laporan assesment risiko langkah 3**

**STEP 4. Select and implement risk control measures**

Instructions: List any requirements that have been prescribed by international and national regulations, legislation, guidelines, policies and strategies on biosecurity and biosafety. In addition, consider if there are any local regulations, guidelines or policies that restrict or govern certain laboratory activities and/or the handling and use of any biological agents.

Describe the measures required by national legislation or regulations (if any).

Describe the measures advised by guidelines, policies and strategies (if any).

• WHO guidelines on TB  
• WHO Laboratory biosafety manual, fourth edition

Instructions: Describe where and when risk control measures are needed, the residual risk when these risk control measures are in place, and an assessment of the availability, effectiveness and sustainability of the risk control measures.

Laboratory activity/procedure	Selected risk control measure(s)	Residual risk (very low, low, medium, high, very high)	Is the residual risk acceptable? (yes/no)	Are risk control measures available, effective and sustainable? (yes/no)	Likelihood of exposure/release		
					Unlikely	Possible	Likely
Spill of patient specimens, with production of aerosols	Transport in sealed container	Low	Yes	Yes	Medium	High	Very High
Spill of or contamination from patient specimens	Wear gloves when handling any patient specimens/slides; disinfect work area daily; wash hands in sink available in adjacent room that is not used for laboratory work (contamination of doors and other items by contaminated gloves must be avoided)	Low	Yes	Yes	Low	Medium	High
Sharps injury from handling glass slides	Use sharps containers whenever possible	Very low	Yes	Yes	Very low	Low	Medium
Exposure to improperly treated waste	Autoclave will be validated monthly	Very low	Yes	Yes, if indicators for validating the autoclave are readily available	Very low	Low	Medium

Overall residual risk:  Very low  Low  Medium  High  Very high

If the residual risk is still unacceptable, further action is necessary such as additional risk control measures, based on the initial risk evaluated in STEP 3; outlining the scope of work such that it is acceptable with existing risk control measures in place or identifying an alternative laboratory with appropriate risk control strategies already in place that is capable of conducting the work as planned.

Should work proceed with selected risk control measures?  Yes  No

Approved by (Name and title): Omar Abusolek, Microbiology Laboratory Manager

Approved by (Signature): Omar Abusolek

Date: 29 July 2020

Instructions: Describe how to communicate risks and risk mitigation strategies to personnel. Provide a mechanism of communication within the laboratory. Describe the process and timeline for ensuring that all identified risk control measures are put-based, how associated SOPs and training has been completed before starting the laboratory work.

Communication of the hazards, risks and risk control measures

- SOPs will be updated with new risk control measures for specimen transport, PPE use, sharps disposal, hand washing, disinfection and decontamination.
- Signs and job aids will be updated and displayed.

Purchase (and budgeting) of risk control measures

Additional gloves, sharps containers and biological indicators will be added to laboratory operating budget for approval and purchase.

Operational and maintenance procedures

Autoclave SOP will be updated for more frequent validation.

Training of personnel

Personnel will be trained on new SOPs.

**Gambar 6. Contoh laporan assesment risiko langkah 4**

**STEP 5. Review risks and risk control measures**

Instructions: Establish a periodic review cycle to identify: changes in laboratory activities, biological agents, personnel, equipment or facilities; changes in knowledge of biological agents or processes; and lessons learnt from audits/inspections, personnel feedback, incidents and/or near misses.

Frequency of the review	This risk assessment will be reviewed in 6 months to ensure proper implementation of all recommended risk control measures and then annually after that.
Person to conduct the review	The laboratory manager
Describe updates/changes	<ul style="list-style-type: none"> <li>Any culturing of TB is prohibited. If culture becomes necessary, another risk assessment must be performed to evaluate the need for additional risk control measures such as PPE and safety equipment (BSC).</li> <li>MDR-TB and XDR-TB strains exist but are not likely in this setting. If they were suspected in a patient specimen, work would stop for another risk assessment and specimens suspected to be positive for MDR-TB and XDR-TB shipped to another laboratory.</li> </ul>
Personnel/procedures to implement the changes	Additional PPE and/or safety equipment may be necessary in those cases, or specimens could be sent to the central laboratory for further testing.
Reviewed by (Name and title)	Eriko Sebako, RPHL Laboratory Manager
Reviewed by (Signature)	Eriko Sebako
Date	31 July 2020

**Gambar 7. Contoh laporan assesment risiko langkah 5<sup>8</sup>**

**IMPLEMENTASI**

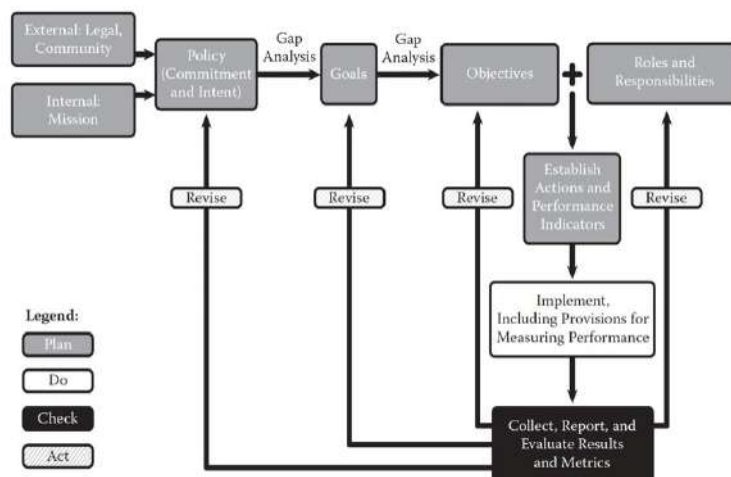
Pada implementasi terdiri dari <sup>2</sup>

- penetapan tanggungjawab terdapat peran dari setiap orang yang terlibat. Penetapan tugas dan tanggungjawab masing-masing mulai dari pimpinan puncak sampai terbawah perlu dilakukan.
- Pelatihan, kewaspadaan dan kompetensi

- c. Kontrol pelaksanaan
  - General safety
  - Informasi penyimpanan agen biologik dan toksin
  - Program kerja
  - Perubahan manajemen
  - Prosedur, dekontaminasi, perlindungan individu
  - Program kesehatan petugas laboratorium
  - Kendali budaya petugas kesehatan
  - Sarana prasarana
  - Transportasi agen biologik dan toksin
  - Sekuriti individu
- d. Respon emergensi

## EVALUASI MANAJEMEN BIORISIKO

Evaluasi manajemen risiko dapat dilakukan dengan berbagai pendekatan antara lain melalui audit, inspeksi, kuesioner, interview, evaluasi training, dan laporan insiden. Setiap pendekatan memiliki kelebihan dan kekurangan. Implementasi manajemen biorisiko perlu dinilai dengan target terukur dalam indikator performa. Indikator ini dapat diambil dari berbagai fase implementasi dalam 1 siklus *plan-do-study-act* (PDSA). Gambar 8 menunjukkan area evaluasi manajemen biorisiko.<sup>1</sup>



**Gambar 8. Plan-Do-Check-Act dalam alur penilaian manajemen biorisiko<sup>1</sup>**

## RINGKASAN

Telah dikemukakan manajemen biorisiko yang meliputi elemen biosafety dan biosecurity. Terdapat berbagai panduan dalam manajemen biorisiko yang pada umumnya seiring dengan panduan WHO. Pada tahap awal dilakukan *assesment* risiko dan pelaporannya berisi informasi lengkap sehingga penerapan pada laboratorium menjadi tepat dan efisien. Setiap laboratorium seyogyanya melakukan *assesment* risiko pada saat ada ada agen infeksi baru, toksin, reagen atau substansi yang berbahaya, prosedur baru, alat baru, perubahan personal, perubahan pada manufaktur atau suplai terhadap materi *consumable*. Manajemen risiko perlu dilakukan penilaian kembali dan performa manajemen diukur dalam indikator dalam suatu siklus PDSA.

## KEPUSTAKAAN

1. Arndt WD, Gribble LA, Boggs S, Breitenbaumer S, Brodsky B, Burnett LA, et al. Laboratory biorisk management: Biosafety and biosecurity. Florida: CRC Press Taylor and Francis Group; 2015.
2. World Health Organization. Laboratory biorisk management: Strategic framework for action 2012–2016. Geneva.2012. p. <https://www.who.int/publications/i/item/WHO-HSE-2012.3>.
3. World Health Organization. Biorisk management: Laboratory biosecurity guidance. Geneva.2006.p.[https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/69390/WHO\\_CDS\\_EPR\\_2006.6\\_eng.pdf?sequence=1](https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/69390/WHO_CDS_EPR_2006.6_eng.pdf?sequence=1).
4. Lestari F, Kadir A, Miswary T, Maharani CF, Bowolaksono A, Paramitasari D. Implementation of Bio-Risk Management System in a National Clinical and Medical Referral Centre Laboratories. Int J Environ Res Public Health. 2021;18(5).
5. Naroeni A, Bachtiar EW, Ibrahim F, Bela B, Kusminanti Y, Pujiriani I, et al. Challenges in implementing a biorisk management program at Universitas Indonesia: A checklist tool for biorisk management. Health Secur. 2016;14(6):375-81.
6. Appelt S, Jacob D, Rohleder AM, Bråve A, Szekely Björndal Å, Di Caro A, et al. Assessment of biorisk management systems in high containment laboratories, 18 countries in Europe, 2016 and 2017. Euro Surveill. 2020;25(36).
7. Bathula SR, Rakhimol A. Global Trends in Biorisk Management. BioRisk. 2017;12:1-23.
8. World Health Organization. Laboratory biosafety manual and associated monograph: Risk Assesment. Geneva.2020. p. <https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/337956/9789240011311-eng.pdf?sequence=1>.

## **3.2. MOLECULAR LABORATORY DESIGN**

Yekti Hediningsih  
Balai Laboratorium Kesehatan dan Pengujian Alat Kesehatan  
Provinsi Jawa Tengah

### **PENDAHULUAN**

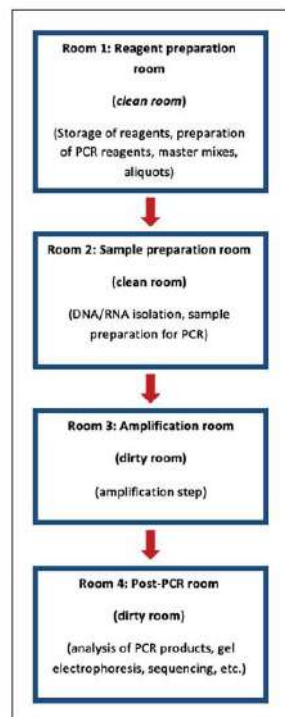
Laboratorium molekuler di Indonesia jumlahnya meningkat sangat cepat sejak terjadi pandemi. Sekitar 742 laboratorium telah terdaftar sebagai laboratorium untuk pemeriksaan covid 19 pada tahun 2021.<sup>1</sup> Laboratorium Covid 19 merupakan awal tersebarnya laboratorium molekuler secara masif dan dengan adanya transformasi kesehatan paska pandemi, kebijakan adanya laboratorium biomolekuler milik pemerintah di tingkat provinsi dan kabupaten kota telah bergulir. Kementerian Kesehatan RI telah mencantumkan adanya layanan laboratorium molekuler dalam pelayanan laboratorium klinik di pedoman desain tipikal laboratorium kesehatan.<sup>2</sup> Ruang yang memadai, peralatan yang sesuai, dan personel yang berkualifikasi diperlukan untuk mendirikan laboratorium molekuler. Meskipun persyaratan spesifik dapat bervariasi tergantung pada spektrum pengujian yang akan dilakukan, ada beberapa kriteria dasar yang perlu dipenuhi untuk standardisasi.<sup>3</sup>

### **MOLECULAR LABORATORY DESIGN**

Salah satu poin terpenting yang harus dipertimbangkan ketika merancang laboratorium patologi molekuler adalah membuat rencana untuk mencegah kontaminasi. Hasil positif palsu dapat terjadi karena kontaminasi dari sampel ke sampel, pengangkutan amplicon dari amplifikasi sebelumnya pada target yang sama, kontaminasi silang dari berbagai reaksi yang disiapkan secara bersamaan, dan kontaminasi reagen dengan templat DNA<sup>3</sup>

Kontaminasi berkurang secara signifikan dengan pemisahan fisik antara area bersih dan kotor serta dengan melakukan aktivitas pra PCR dan paska-PCR di ruangan terpisah. Oleh karena itu, perencanaan setidaknya dua ruangan terpisah sangat penting saat merancang laboratorium molekuler. Disarankan untuk melakukan langkah-langkah persiapan sampel seperti isolasi asam nukleat di laboratorium pra-PCR, dan melakukan reaksi PCR serta prosedur paska-PCR lainnya di laboratorium paska-PCR. Namun jika tersedia cukup ruang, direkomendasikan empat ruangan terpisah untuk penyiapan reagen,

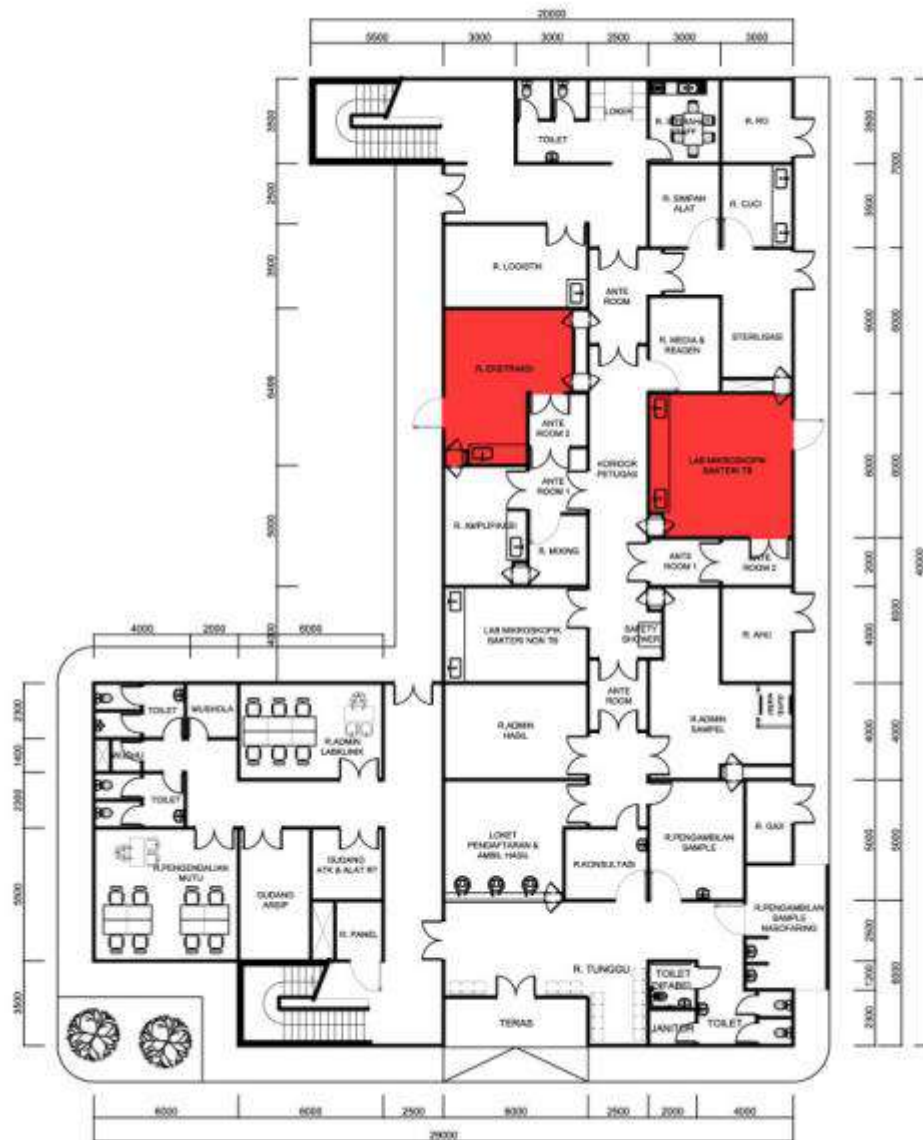
penyiapan sampel, langkah PCR dan langkah-langkah paska-PCR untuk laboratorium molekuler yang ideal. Setiap ruangan harus memiliki peralatan, pakaian pelindung, dan bahan habis pakai masing-masing, dan tidak boleh ada pengangkutan material/peralatan antar ruangan. Persyaratan untuk desain laboratorium dapat bervariasi sesuai dengan metode yang digunakan. Misalnya, 3 ruangan ideal di laboratorium yang menerapkan metode RT-PCR, karena analisis paska-PCR tidak diperlukan dalam metode RT-PCR.



**Gambar 1: Desain dan Alur Kerja Laboratorium Molekuler Ideal<sup>3</sup> (modifikasi)**

Laboratorium diagnostik molekuler harus memiliki setidaknya dua, sebaiknya tiga ruangan, masing-masing dengan luas minimal 15 meter persegi, secara fisik terpisah satu sama lain untuk memungkinkan alur kerja searah (dari pra amplifikasi hingga paska amplifikasi) dan sebaiknya dengan sistem ventilasi terpisah. Jika hanya dua ruangan yang dapat disediakan untuk laboratorium molekuler, prosedur pra amplifikasi dan analisis amplifikasi atau paska amplifikasi harus dilakukan di ruangan yang terpisah. Kontaminasi bisa diminimalisir atau dikontrol dengan praktek laboratorium yang baik dan desain laboratorium yang sesuai standar.<sup>4</sup>





**Gambar 2. Denah Tipikal Lab Biomolekuler Labkes.**

Ruang Bertekanan Negatif (warna merah)<sup>2</sup>

Saat merancang laboratorium atau mengatur alur kerja, pastikan pasien dan sampel pasien tidak memiliki jalur yang sama. Jalur sirkulasi harus dirancang sedemikian rupa sehingga kontak antara masyarakat dan bahan biologis hanya dapat terjadi di ruangan tempat pengambilan sampel pasien. Meja resepsionis tempat pendaftaran pasien masuk harus ditempatkan sedekat mungkin dengan pintu masuk. Akses ke ruangan tempat analisis sampel dilakukan, atau tempat penyimpanan bahan kimia berbahaya atau bahan lainnya, harus dibatasi hanya untuk orang yang berwenang, biasanya staf teknis

laboratorium dan staf pemeliharaan. Pembatasan akses dapat dilakukan dengan menggunakan tanda pada pintu, kunci jika perlu, dan lencana identifikasi staf.<sup>5</sup>

Beberapa hal yang perlu dipertimbangkan saat merancang laboratorium antara lain akses terhadap peralatan untuk masuk dan pemeliharaan. Pastikan tidak ada batasan fisik untuk akses, seperti ukuran pintu dan elevator, yang dapat menimbulkan masalah pada pengiriman dan pemeliharaan mesin dan peralatan baru. Kebutuhan daya listrik yang stabil untuk peralatan sensitif dan generator darurat saat sumber daya utama laboratorium mati. Perencanaan penataan ruang yang baik akan menjamin layanan terbaik. Tata kelola pembuangan cairan dari peralatan, pembuangan reagen cair, produk sampingan, dan limbah dari peralatan dan prosedur laboratorium juga harus menjadi perhatian utama. Saat menempatkan peralatan di laboratorium, pertimbangkan bagaimana limbah cair akan ditangani. Kepatuhan pemenuhan persyaratan lokal dan nasional mengenai pembuangan limbah cair, bertujuan untuk mencegah kontaminasi sistem pembuangan limbah masyarakat dengan patogen atau bahan kimia beracun.<sup>5,6</sup>

Ruangan harus memiliki langit-langit tinggi untuk memastikan ventilasi yang baik, dan dinding serta langit-langit harus dicat dengan cat mengkilap yang dapat dicuci atau dilapisi dengan bahan yang sesuai untuk pembersihan dan disinfeksi. Lantai juga harus mudah dibersihkan dan didisinfeksi, serta tidak memiliki tepian antara dinding dan lantai (harus melengkung).<sup>5,6</sup> Beberapa contoh laboratorium molekuler telah dibangun dengan spesifikasi sebagai berikut: lantai dari vynil homogeneous 2 mm antibacterial, dinding material sandwich panel 50 mm, pass box, ACH (Air Change Hour) 20x on operation, 4x idling, tekanan negative, AHU dan tata udara.

## **SIMPULAN**

Perancangan desain laboratorium molekuler harus mempertimbangkan dengan penilaian faktor risiko keamanan dan keselamatan baik petugas maupun lingkungan. Desain yang baik, perawatan yang baik dan instalasi yang tepat, akan berkontribusi pada pelayanan laboratorium molekuler yang terbaik.



## DAFTAR PUSTAKA

1. Keputusan Menteri Kesehatan Republik Indonesia Nomor Hk.01.07/Menkes/4642/2021 Tentang Penyelenggaraan Laboratorium Pemeriksaan Coronavirus Disease 2019 (Covid-19)
2. Kementerian Kesehatan RI Direktorat Jenderal Pelayanan Kesehatan Direktorat Fasilitas Pelayanan Kesehatan. Pedoman Desain Tipikal Laboratorium Kesehatan (Labkes). Jakarta: Kementerian Kesehatan RI 2021.
3. AYSAL A et al. How to Set Up a Molecular Pathology Lab. Turk Patoloji Derg Vol. 36, No. 3, 2020; Page 179-187
4. Rachel Lee, Ph.D. Laboratory Design QA/QC Considerations. Texas Department of State Health Services. March 12<sup>th</sup> 2015
5. WHO LQMS - Information on Laboratory Design. <https://extranet.who.int/lqsi/sites/default/files/attachedfiles/LQMS%20-2%20to%202-4%20Laboratory%20design.pdf>
6. WHO. Laboratory design and maintenance. Laboratory biosafety manual and associated monographs ,4<sup>th</sup> edition. <https://www.who.int/publications/i/item/9789240011397>

### 3.3. NEXT-GENERATION SEQUENCING (NGS)

Basti Andriyoko  
Laboratorium Patologi Klinik, Divisi Mikrobiologi Klinik dan Biologi Molekuler  
RSUP Dr Hasan Sadikin/Universitas Padjadjaran

#### PENDAHULUAN

*Next-generation sequencing* (NGS) atau disebut juga *massively parallel sequencing* merupakan teknologi baru untuk pemeriksaan *sequencing* DNA dan RNA serta deteksi varian atau mutasi. Deteksi *sequence* varian atau mutasi dengan NGS telah digunakan untuk diagnosis penyakit, penentuan prognosis, terapi, dan pemantauan pasien yang mengarah kepada *personalized precision medicine*.<sup>1</sup>

Metode *sequencing* telah berkembang dari generasi pertama hingga generasi ketiga. Saat ini telah banyak digunakan NGS baik generasi kedua dan ketiga untuk kebutuhan *whole genome sequencing* (WGS) ataupun *targeted sequencing*. Perbedaan antara generasi dapat dilihat pada **Gambar 1** dan **Tabel 1**.

#### PERKEMBANGAN METODE SEQUENCING

##### - Generasi pertama

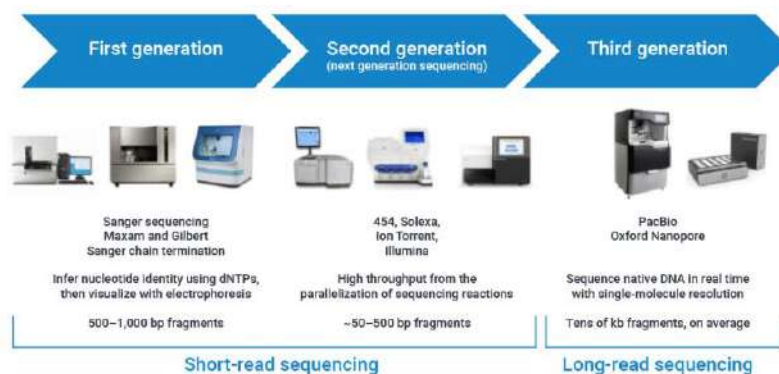
Terdapat 2 metode generasi pertama DNA *sequencing*, yaitu: metode Maxam-Gilbert (*chemical degradation*) dan metode Sanger (*chain termination*) yang berbasis amplifikasi *template* DNA dan gel elektroforesis. Kelemahan dari generasi pertama ini adalah dari segi biaya dan waktu pemeriksaan.<sup>2</sup>

##### - Generasi kedua

Generasi kedua *sequencing* dapat melakukan WGS secara lebih cepat, yang kemudian dikenal dengan istilah *next-generation sequencing* (NGS). Contoh generasi kedua adalah: Roche 454, Illumina, SOLiD, and Ion Torrent platforms.<sup>2</sup>

##### - Generasi ketiga

Peningkatan kebutuhan untuk *sequencing* menuntut perkembangan metode *sequencing* yang lebih cepat, biaya rendah, dan semakin kecilnya tingkat kesalahan. Saat ini telah dikembangkan generasi ketiga *sequencing* dengan kemampuan untuk membaca *sequence* lebih panjang, biaya lebih murah dan lebih cepat. Contoh dari metode ini adalah *Pacific Bioscience* and *Oxford Nanopore Technology*.<sup>2</sup>



**Gambar 1 Perkembangan Generasi Alat dan Metode Sequencing<sup>3</sup>**

**Tabel 1 Perbedaan antar Generasi Sequencing<sup>4,5</sup>**

	First generation	Second generation	Third generation
Fundamental technology	Size-separation of specifically end-labeled DNA fragments, produced by SBS or degradation	Wash-and-scan SBS	SBS, by degradation, or direct physical inspection of the DNA molecule
Resolution	Averaged across many copies of the DNA molecule being sequenced	Averaged across many copies of the DNA molecule being sequenced	Single-molecule resolution
Current raw read accuracy	High	High	Moderate
Current read length	Moderate (800–1000 bp)	Short, generally much shorter than Sanger sequencing	Long, 1000 bp and longer in commercial systems
Current throughput	Low	High	Moderate
Current cost	High cost per base Low cost per run	Low cost per base High cost per run	Low-to-moderate cost per base Low cost per run
RNA-sequencing method	cDNA sequencing	cDNA sequencing	Direct RNA sequencing and cDNA sequencing
Time from start of sequencing reaction to result	Hours	Days	Hours
Sample preparation	Moderately complex, PCR amplification not required	Complex, PCR amplification required	Ranges from complex to very simple depending on technology
Data analysis	Routine	Complex because of large data volumes and because short reads complicate assembly and alignment algorithms	Complex because of large data volumes and because technologies yield new types of information and new signal processing challenges
Primary results	Base calls with quality values	Base calls with quality values	Base calls with quality values, potentially other base information such as kinetics

**Keterangan:**

- *Sequencing by synthesis (SBS): Sequencing methods that determine the sequence of a DNA template by synthesizing the complementary DNA.*
- *Wash-and-scan techniques: These use DNA polymerases just like any other reagent, washing them off after adding a base or an oligonucleotide during an SBS reaction. The many cycles of these approaches necessarily consume a lot of reagents and time.*
- *Read length: The number of individual bases identified contiguously in a read defines its length. Read length can be defined by base-calling software from the instrument output alone, by alignment to a known reference sequence, or by alignment to a de novo assembly of sequence.*

- *Direct RNA sequencing: RNA can be sequenced directly by replacing the DNA polymerase in a sequencing reaction with a reverse transcriptase or other RNA-dependent polymerase. Third-generation technologies that dispense with polymerases altogether also have the potential to sequence RNA directly, and in all cases, direct RNA sequencing offers potential decreases in time to result and much more accurate RNA sequencing as cDNA conversion steps are not required prior to sequencing.*

## **TAHAP PEMERIKSAAN NGS**

Prosedur pemeriksaan NGS terdiri dari beberapa unsur utama yaitu: ekstraksi sampel, fragmentasi DNA, persiapan *library*, *sequencing*, analisis bioinformatik dan interpretasi (**Gambar 2**).<sup>1,6</sup>

- **Ekstraksi sampel**

*Next-generation sequencing* dapat dilakukan pada seluruh sampel yang memiliki DNA atau RNA (contoh: kultur sel, jaringan, darah, cairan tubuh, bakteri, virus, dan lain-lain). Hasil ekstraksi harus menghasilkan kualitas dan jumlah asam nukleat yang baik dan tinggi. Kualitas dapat dinilai dengan menggunakan alat spektrofotometer seperti Nanodrop, hasil yang baik umumnya apabila memiliki kemurnian 1.8 untuk DNA dan 2.0 untuk RNA.<sup>6</sup>

- **Fragmentasi DNA dan persiapan *library***

Fragmentasi DNA bertujuan untuk memotong DNA target menjadi segmen-segmen pendek dengan panjang berkisar 100-300 bp. Persiapan *library* adalah proses memodifikasi segmen DNA sehingga setiap sampel DNA memiliki index spesifik atau identifikasi sebagai penanda setiap DNA pasien. Proses ini penting untuk dapat dilakukannya *massive parallel sequencing* atau *sequencing* terhadap beberapa sampel DNA pasien secara bersamaan.<sup>1</sup>

- ***Sequencing***

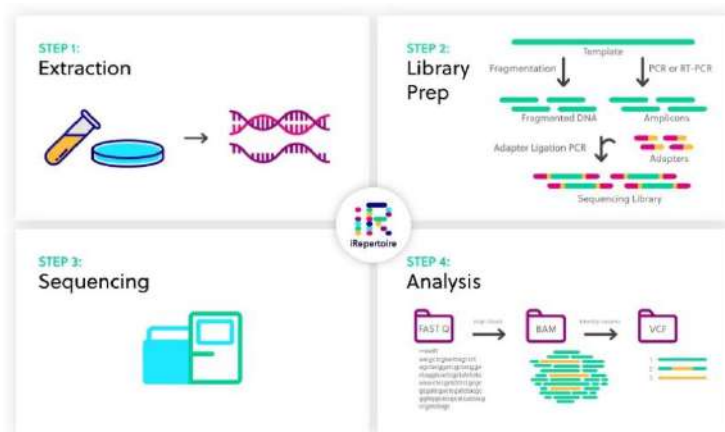
Sampel *library* dimasukkan ke dalam matriks *sequencing* pada *sequencer* NGS untuk dilakukan *massive parallel sequencing*. Matriks *sequencing* dapat berbeda pada setiap *sequencer*, contoh: pada NGS Illumina menggunakan *flow cells* sedangkan pada Ion Torrent menggunakan *chips*.<sup>1</sup>

- **Analisis bioinformatik dan interpretasi**

Pada analisis bioinformatik dilakukan pembacaan basa, *alignment*, dan identifikasi varian. Pada proses ini hasil *sequencing* dibandingkan dengan referensi genome yang

telah ada untuk mengidentifikasi apakah terdapat varian/mutasi. Interpretasi juga dilakukan untuk mengidentifikasi sifat biologis dan signifikansi terhadap klinis.<sup>1</sup>

Tahap-tahap pemeriksaan NGS tersebut diatas menggunakan ruangan yang sama dengan tahapan pada PCR. Ekstraksi sampel dilakukan diruangan ekstraksi, persiapan reagen untuk *library* dilakukan di *clean room*, pencampuran reagen dengan sampel dilakukan di ruang ekstraksi, dan tahapan *sequencing* dilakukan di ruang PCR/amplifikasi.



**Gambar 2 Tahapan Pemeriksaan NGS<sup>6</sup>**

## APLIKASI PEMERIKSAAN SEQUENCING

Pemeriksaan NGS telah digunakan secara luas di berbagai bidang. Saat ini NGS telah mulai digunakan pada aplikasi klinis untuk membantu diagnosis, prognosis, dan terapi pasien. Berikut beberapa contoh aplikasi NGS:

### - Bidang onkologi

Pemeriksaan NGS telah diterapkan pada onkologi klinik untuk personalisasi pengobatan kanker (*personalized treatment of cancer*). *Next generation sequencing* digunakan untuk identifikasi *novel* mutasi dan mutasi yang jarang pada kanker, membantu deteksi karier mutasi kanker pada keluarga (*hereditary cancer syndrome*) karena sekitar 5-10% kanker bersifat herediter, dan membantu untuk *targeted therapy* pada kanker.<sup>7</sup>

### - Bidang infeksi

*Next generation sequencing* dapat menentukan *sequence* genome lengkap dari DNA atau RNA patogen dan dari data tersebut dapat diperoleh informasi mengenai

resistensi, virulensi, serta dapat berguna untuk *surveilans* atau penyelidikan kejadian wabah.<sup>8</sup>

- ***Noninvasive prenatal testing (NIPT)***

Pemeriksaan NGS dapat membantu dalam mendeteksi kelainan-kelainan kongenital. Saat ini telah berkembang pemeriksaan *noninvasive prenatal testing* (NIPT) dengan NGS untuk skrining kelainan kromosom. Teknik ini menganalisis sel fetus atau *cell free DNA* yang terdapat pada darah ibu, tes ini lebih bersifat skrining bukan diagnostik.<sup>9</sup>

## **KESIMPULAN**

*Next generation sequencing* merupakan pemeriksaan molekuler yang memungkinkan analisis genome lebih dalam dan teliti untuk menunjang *personalized precision medicine*. Pemeriksaan menggunakan NGS telah banyak diaplikasikan ke dalam praktek klinis sehari-hari seperti pada bidang onkologi, infeksi, dan skrining neonatal. Hal yang terpenting dalam penerapan teknologi NGS adalah diperlukannya sumber daya manusia yang mumpuni untuk melakukan pemeriksaan mulai dari tahap pemeriksaan sampai dengan interpretasi hasil.

## **DAFTAR PUSTAKA**

1. Qin D. Next-generation sequencing and its clinical application. *Cancer biology & medicine*. 2019;16(1):4-10.
2. Eren K, Taktakoğlu N, Pirim I. DNA Sequencing Methods: From Past to Present. *The Eurasian journal of medicine*. 2022;54(Suppl1):47-56.
3. Pacbio. Sequencing 101: the evolution of DNA sequencing tools. 2020 [Tersedia dari: <https://www.pacb.com/blog/the-evolution-of-dna-sequencing-tools/>].
4. Mestan KK, Ilkhanoff L, Mouli S, Lin S. Genomic sequencing in clinical trials. *Journal of Translational Medicine*. 2011;9(1):222.
5. Schadt EE, Turner SW, Kasarskis A. A window into third-generation sequencing. *Human molecular genetics*. 2010;19 R2:R227-40.
6. iRepertoire. NGS overview: from sample to sequencer to results. 2023 [Tersedia dari: <https://irepertoire.com/ngs-overview-from-sample-to-sequencer-to-results/>].
7. Guan YF, Li GR, Wang RJ, Yi YT, Yang L, Jiang D, et al. Application of next-generation sequencing in clinical oncology to advance personalized treatment of cancer. *Chinese journal of cancer*. 2012;31(10):463-70.
8. Deurenberg RH, Bathoorn E, Chlebowicz MA, Couto N, Ferdous M, García-Cobos S, et al. Application of next generation sequencing in clinical microbiology and infection prevention. *Journal of biotechnology*. 2017;243:16-24.

9. Norwitz ER, Levy B. Noninvasive prenatal testing: the future is now. *Reviews in obstetrics & gynecology*. 2013;6(2):48-62.

## **BAB 4**

### **OPTIMIZING DIGITAL PLATFORM IN VERIFICATION AND VALIDATION LABORATORY RESULT**

#### ***4.1. DIGITAL PLATFORM IN LABORATORY SERVICE AND ITS APPLICATION IN VERIFICATION AND VALIDATION***

<sup>1,2</sup>Dr. dr. Asvin Nurulita, M.Kes, Sp.PK(K)

<sup>1</sup>Departemen Ilmu Patologi Klinik, Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin Makassar;

<sup>2</sup>RSUP dr. Wahidin Sudirohusodo, Makassar

#### **1. BACKGROUND**

Hospital Management Information System is one of the important elements that play a role in improving the quality, quality, and efficiency of health services in hospitals.(1) All data including clinical, medical and laboratory data are combined through the digitization process.

The development of computer-based hospital laboratory information systems has become a major focus in an effort to improve quality, efficiency and accuracy in laboratory services.(2) Through analysis, it was found that repetitive manual tasks, such as recording data, inventory tracking, and report generation, resulted in a waste of time and also increased human error. (3) In addition, fragmented and unintegrated systems in the laboratory hinder the smooth flow of information, reduce operational efficiency, and increase the risk of errors.(3) Reporting is also limited and takes longer.(3) Based on this background, an efficient and accurate laboratory information system was developed through a laboratory digital platform.(2) The use of digital platforms in laboratory services refers to online/software platforms that facilitate various aspects of laboratory services and operations.

Digital-based laboratory services are used to shorten time, simplify data management and improve communication in the laboratory.(5) This platform utilizes technology to streamline and improve laboratory processes. This platform utilizes technology to streamline and improve laboratory processes, data management, and communication within the laboratory environment. (2) One of the platforms that has been used in the laboratory is the open-source generic management information system platform (SIMGOS), which is an information system owned by the ministry of health that can be used by health facilities and can be combined with laboratory devices /



equipment to facilitate sample requests and management. Data results from laboratory equipment are accurately entered into the platform to prevent the risk of data mix-ups or errors and obtain real-time data on laboratory equipment so as to improve timeliness. Although directly connected to the device, the process of verification and validation of results must still be carried out to maintain the Quality of Laboratory Services. (5)

## **2. DISCUSSION**

Laboratory management using a computer-based online system makes it easier for patients and medical personnel. With an online system, laboratory results can be accessed by the doctor in charge without having to wait for the laboratory result sheet to be sent to the poly or hospitalization room, so that patients can be treated immediately, patient waiting time is reduced, more efficient and cost-effective. The following describes the flow of using a digital laboratory:

1. Request for laboratory examination

Users can order laboratory examinations electronically, so there is no need to use manual documents. The platform enables easy sample tracking and management, including barcoding, sample routing, and documentation.

2. Electronic Data Capture

Laboratory technicians can enter test results directly into the digital platform, reducing the risk of transcription errors and ensuring real-time data availability.

3. Laboratory Information Management System

The laboratory information management system module in the platform enables efficient management of laboratory workflows, including sample tracking, inventory management, quality control, and reporting.

4. Integration with Laboratory Instruments

The digital platform can interface with various laboratory instruments and devices, automating data capture and minimizing manual data entry. This integration improves efficiency, accuracy, and traceability of test results.

5. Reporting and Analysis

The platform provides customizable reporting capabilities, allowing users to generate reports and analyze data trends. This feature is useful for quality assurance, performance monitoring, and regulatory compliance.

6. Client and Clinician Portals

The platform can offer portals for clients (such as hospitals, clinics, or research institutes) and clinicians, allowing them to access test results, place orders, and communicate with the laboratory.

#### 7. Workflow Automation

The platform can automate routine laboratory workflows, such as result validation, instrument maintenance scheduling, and notification alerts for important results.

#### 8. Secure Data Storage and Privacy

The digital platform ensures the security and privacy of patient data, by complying with applicable regulations and standards, such as HIPAA (Health Insurance Portability and Accountability Act) in the United States.

#### 9. Interoperability and Integration

The platform can integrate with other health systems, such as electronic medical records that enable seamless data exchange and collaboration across different healthcare settings.

One example of a digital platform in laboratory services is LabWare LIMS (Laboratory Information Management System). LabWare LIMS is a comprehensive software solution designed to streamline laboratory workflow and data management. The solution offers features such as test ordering, sample management, electronic data capture, instrument integration, reporting and analysis, and secure data storage.

LabWare LIMS is widely used in various industries, including healthcare, pharmaceutical, biotechnology, and research institutions. LabWare LIMS provides a robust and scalable platform to manage laboratory operations efficiently and effectively. By automating manual processes, ensuring data integrity, and facilitating seamless communication, LabWare LIMS enables laboratories to improve productivity, quality, and compliance.

There are several benefits of laboratory digital services, among others:

#### 1. Improving efficiency and productivity

Digital transformation allows scientists to communicate within groups and across departments, share real-time data between laboratories and stay connected to evolving customer needs.

#### 2. Increasing transparency

This automated data increases transparency by identifying trends in processes and practices that lead to incremental and consistent improvements across all aspects of the laboratory.

3. Save costs

Digital laboratories enable more efficient collaboration both within and between laboratories. This makes training, troubleshooting, and maintenance easier for staff, ultimately saving costs by increasing tool uptime.

4. Increased profitability

Minimizing costs, identifying inefficiencies, and running quality practices will increase revenue. About 80% of laboratories report that digital transformation has improved profitability

5. Improved customer satisfaction

Technological innovations enable organizations to collect and analyze customer data to improve existing products and create new products and services.

6. Increased flexibility and resilience

The COVID-19 pandemic has placed greater emphasis on the need for laboratories to be flexible and resilient. Hence the adoption of data analytics, automation, and other digital tools that make it possible to use and share resources online.

7. Good inventory management

An integrated inventory management process provides visibility by connecting valuable information about raw materials, suppliers, delivery methods, and ultimately customer satisfaction.

Digitizing laboratory data greatly simplifies record-keeping. Researchers can easily sort, label, store, access and search digital data. Today, digital data can be encrypted, securely stored in clouds, and protected by access controls. In addition, digital data makes it easy to create a complete audit trail for intellectual property protection or regulatory compliance.

Digital data platforms can automatically track data entry or editing with timestamps, so it is very clear who contributed to new ideas and when intellectual property was generated. Overall, laboratory digitization improves processes, simplifies workflows, and makes research and development more efficient. In addition, with major

advances in machine learning, deep learning, and artificial intelligence, laboratories are becoming smarter.

In Indonesia, the laboratory digital system has been launched since 2013. Based on the regulation of the Minister of Health of the Republic of Indonesia number 82 of 2013 concerning hospital management information systems (SIMRS), hospitals are required to implement SIMRS. (4) The flow of using laboratory SIMRS is almost the same as that developed in other countries. At Wahidin Sudirohusodo Hospital, the hospital management information system uses the SIMRS GOS (Generic Open Source) application. SIMRS GOS is a web-based application that summarizes all activities in the hospital managed in one monitor system by one person assisted by other people. (4) SIMRS/SIMKlinik GOS on the registration feature is in accordance with the standard variable registration, double validation of medical records and BPJS bridging which consists of:

#### Front Office Module:

1. Registration
2. Inpatient Admission
3. Outpatient Services
4. Inpatient Services
5. Emergency room services
6. Laboratory Services
7. Laboratory Services
8. Radiology Services
9. Pharmacy Services
10. Operating Room Services
11. Billing/Payment

#### Back Office Module

1. Warehouse
2. Nutrition (optional)
3. Accounting/Finance
4. Decision Support system (optional)
5. Administrator
6. Bed availability

7. Business Intelligence (Android, IOS) (optional)

#### Integration Module

1. e-Claim
2. SEP BPJS
3. SIRS
4. Online Hospital
5. SIRANAP
6. SISRUITE (plus telemedicine)
7. Online Registration

The flow of laboratory tests using SIMRS starts from the Treatment Room ordering laboratory tests, which can then be seen through the SIMGOS application, analysts from the laboratory then receive orders and print joblists according to requests. After that, the barcode is given and the sample is inserted into the tool, after being inserted into the tool, it will be inputted automatically in the Vans application and then validated. (4) VANS is a Laboratory Information System software that can be easily configured to suit the needs of the modern laboratory. Designed to assist routine laboratory work, improve quality control, optimize instrument use and provide users with fast statistical data. Built based on Windows technology makes the application program easy and intuitive. In addition, it can store large data using the Firebird database engine. (6) If the results show a critical value, a critical value will appear marked in red in the Vans application, which will then be confirmed to the clinician regarding the patient's condition before being validated. After validation, the critical value will appear in the SIMGOS monitoring section as evidence of reporting critical values to the clinician. After that, the results can be finalized by DPJP with a barcode. Finalized results can be seen by the requesting DPJP through the SIMGOS application.

Verification and validation of laboratory results has the objective of demonstrating that the system conforms to its specifications and that it delivers the expected results. Verification is the process of gathering objective evidence that the user can meet the performance of the method used during validation. Validation is the process of gathering objective evidence that the requirements for a particular intended purpose/use are met. Validation is always performed on new tools and software systems to verify that the method is already providing accurate laboratory results. Verification methods that can be performed are accuracy tests, precision tests and the application of

the range of values of the results that the device can perform. The validation methods indicated include, accuracy, precision, reference value range, sensitivity test and specificity test. The installation of the VAN system in SimGOS provides convenience in the verification and validation process.

## REFERENCES

1. Rijki NM, Ikasari IH. Implementasi Sistem Infomasi Manajemen Rumah Sakit. JRIIN: Jurnal Riset Informatika dan Inovasi. 2023;1(1):271-3.
2. Tangdililing ML, Pramarta V. THE ROLE OF LABORATORY INFORMATION SYSTEM IN IMPROVING THE QUALITY OF LABORATORY SERVICES PERAN SISTEM INFORMASI LABORATORIUM DALAM MENINGKATKAN MUTU PELAYANAN LABORATORIUM. Jurnal Ilmu Kesehatan dan Gizi.2023;1(3):185-94.
3. Gungoren MS. Crossing the chasm: Strategies For Digital Transformation In Clinical Laboratories. Clinical Chemistry And Laboratory Medicine (CCLM). 2023;61(4):570-5.
4. Kaldian F, editor Pentingnya Penggunaan Sistem Informasi Manajemen Rumah Sakit Generik Open Source (SIMRS GOS) dalam Meningkatkan Mutu Pelayanan Rumah Sakit2015.
5. Jovičić S, Vitkus D. Digital transformation towards the clinical laboratory of the future. Perspectives for the next decade. Clin Chem Lab Med. 1 Maret 2023;61(4):567–9.
6. Cipta Karya Medika. VANSLab \_ Sistem Informasi Labor

## 4.2. LOGICAL OBSERVATION IDENTIFIERS NAME AND CODES (LOINC)

Maria Immakulata Diah Pramudianti  
KSM Patologi Klinik RSUD Dr. Moewardi Surakarta/  
Bagian Patologi Klinik Fakultas Kedokteran Unoversitas Sebelas Maret Surakarta  
[diahpramudianti@staff.uns.ac.id](mailto:diahpramudianti@staff.uns.ac.id), +62 812 261 2616

### A. Pendahuluan

Institusi laboratorium terakreditasi di Indonesia saat ini sejumlah 1400 laboratorium, dan terdapat perbedaan nama pemeriksaan laboratorium, kode pemeriksaan termasuk kode laboratorium dalam *Laboratory Information System (LIS)*, sehingga data yang ada tidak terstandar dan sangat variatif sehingga menyebabkan data hasil laboratorium tidak bisa dipertukarkan satu sama lain. Berikut terlampir contoh perbedaan penggunaan kode pemeriksaan laboratorium yang berbeda antara instansi laboratorium (Tabel 1.).

**Tabel 1. Perbandingan Istilah Pemeriksaan Laboratorium di Indonesia.**

	KODE LABORATORIUM A	KODE LABORATORIUM B	KODE LOINC
Kalium (K) Urine 24 jam	1001	200309	2829-0
Laju Endap Darah	190893	340578	30341-2
Procalcitonin	717	203	33959-8

*Platform SATUSEHAT* merupakan *platform* interoperabilitas data kesehatan dari Kementerian Kesehatan (Kemenkes) Republik Indonesia yang memungkinkan informasi kesehatan dipertukarkan sewaktu-waktu antara tenaga medis yang berbeda, entitas lain yang berwenang, dan pasien, dalam kondisi aman, rahasia serta perlindungan data lainnya. *Platform SATUSEHAT* menggunakan standar HL7 FHIR dalam pertukaran data dan bekerja seperti *grammar* dalam sebuah pembelajaran bahasa, oleh karenanya diperlukan *vocabulary* yang mendukung.

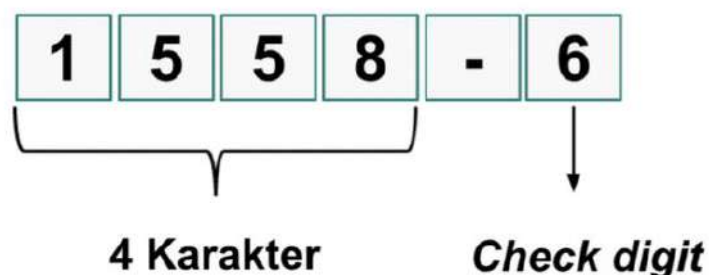
### B. LOINC

*Logical Observation Identifiers Name and Codes (LOINC)* merupakan standar terminologi untuk permintaan dan hasil laboratorium. Standar internasional LOINC dikenalkan pertama kali oleh Regenstrief pada tahun 1994, standarisasi ini untuk mengidentifikasi pengukuran kesehatan, observasi, dokumen, survei, serta identifikasi

universal (istilah dan kode yang terstandarisasi) yang mewakili hasil uji laboratorium dan klinis. Saat ini LOINC telah digunakan di berbagai institusi klinis, fasilitas pelayanan kesehatan, lembaga pemerintahan, sistem kesehatan, penelitian, vendor IT, dan proyek e-Health berskala internasional.

Kategori utama pada LOINC meliputi 4 (empat) hal yaitu laboratorium, klinis, HIPAA *attachment* dan *standardized survey instrument*. Ruang lingkup LOINC laboratorium mencakup apapun yang dapat diukur, diuji, serta diamati terkait suatu spesimen. Ruang lingkup ini berisikan semua kategori seperti hematologi dan perhitungan sel, kimia, mikrobiologi (parasitologi dan virologi), serologi, urinalisis, informasi spesimen, toksikologi obat, antigen HLA, terapi antiretroviral, patologi molekuler, translokasi, dosis obat, dan lain-lain. Penggunaan LOINC sebagai standar terminologi laboratorium meliputi langkah-langkah berikut ini: (1) mempelajari Panduan Terminologi Laboratorium LOINC dan standar LOINC; (2) mempelajari dokumen *template*, prosedur teknis untuk pemetaan terminologi laboratorium; dan (3) mempelajari terminologi laboratorium LOINC dalam format dokumen *excel*.

Terminologi LOINC menyediakan 2 tipe tes yaitu tes laboratorium tunggal yang merupakan pemeriksaan yang dilakukan untuk menguji variabel tunggal (baik untuk pengukuran klinis dan pemeriksaan laboratorium), dan tes laboratorium panel yang merupakan pemeriksaan laboratorium yang dilakukan untuk menguji kumpulan dari variabel tunggal tersebut. Selain itu LOINC terdiri dari lebih 90.000 kode dalam format numerik (angka). Struktur kode LOINC terdiri dari 3 (tiga) hingga 7 (tujuh) karakter dengan digit terakhir yang disebut *check digit* yang berfungsi untuk membantu menghindari kesalahan dalam transkripsi kode. *Check digit* ini selalu terletak setelah tanda penghubung dan selalu berupa angka 0-9. Struktur kode LOINC dapat dilihat pada Gambar 1. berikut ini.



**Gambar 1. Struktur Kode LOINC**



Komponen LOINC terdiri dari 6 komponen utama yaitu (1) *component/analyte* yang mewakili hal yang sedang diukur atau diobservasi. (2) *property* yang mewakili atribut *component/analyte* untuk membedakan karakteristik *component/analyte* yang dapat diukur., (3) *timing* yang merupakan interval waktu dilakukannya pengamatan atau pengukuran., (4) *scale* yang menunjukkan bagaimana sebuah observasi dinilai, (5) *system/specimen* yang menunjukkan jenis spesimen atau “unit analisis” suatu observasi dilakukan, dan (6) *method* yang merupakan satu-satunya komponen LOINC yang bersifat opsional. Diketahui bahwa LOINC menyediakan kode yang berbeda untuk beberapa metode pemeriksaan yang menghasilkan pengukuran dengan sensitivitas berbeda atau dengan interpretasi klinis yang berbeda.

Parameter yang tidak masuk dalam terminologi laboratorium LOINC, dapat diusulkan oleh masing-masing laboratorium dengan mengisi permintaan dan istilah dengan mendaftarkan parameter yang dibutuhkan dan menyerahkannya ke tim *Digital Transformation Office* (DTO) Kemenkes. Pembaharuan terminologi LOINC oleh Kemenkes akan dilakukan setiap 6 bulan sekali. Dasar standarisasi dan pengkodean istilah laboratorium untuk permintaan maupun observasi sampel menggunakan LOINC penting dilakukan agar data permintaan dan observasi laboratorium dapat dipertukarkan antara lembaga kesehatan melalui SATUSEHAT.

### **C. SIMPULAN**

Indonesia SATUSEHAT merupakan *platform* pertukaran data kesehatan atau *health information exchange* (HIE) yang menghubungkan sistem informasi/ aplikasi dari seluruh digital kesehatan Indonesia termasuk laboratorium Kasus pertukaran data laboratorium, *vocabulary* yang dapat mendukung adalah LOINC (*Logical Observation Identifiers Name and Codes*).

### **DAFTAR PUSTAKA**

- DTO (Digital Transformation Office) Kementerian Kesehatan Republik Indonesia (Kemenkes RI). 2022. Buku Panduan Terminologi Laboratorium LOINC (LOINC Laboratory Terminology Playbook), pp: 1-40.
- Regenstrief Institute, Inc. 2020. Quick Start Guide for Mapping to Laboratory LOINC. Indiana Polis, Regenstrief Institute
- Regenstrief Institute, Inc. 2022. Logical Observation Identifiers Names and Codes (LOINC®) Users’ Guide. Indiana Polis, Regenstrief Institute.

Regenstrief Institute, Inc. 2022. SearchLOINC. Diakses pada 17 September 2022, dari <https://loinc.org/search/?t=1&s=helicobacter+pylori+IgG>

## **BAB 5**

### **EVALUTION BLOOD SMEAR AND BONE MARROW ASPIRATION**

#### **5.1. PROSEDUR ASPIRASI SUMSUM TULANG DAN PEMBUATAN PREPARAT**

Maimun Zulhaidah Arthamin  
Departemen Patologi Klinik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya -  
RSUD dr Saiful Anwar  
PDS PatKLI Cabang Malang

#### **Abstract**

Bone marrow is one of the largest non-solid organs in the body. Multipotent stem cells are capable of differentiating into non-lymphoid or lymphoid precursor cells. Bone marrow aspiration provides information about the state of maturation and proliferation of the three hematopoietic lineages (erythropoiesis, myelopoiesis, and thrombopoiesis). The diagnosis and management of many hematologic diseases relies on bone marrow evaluation. Bone marrow examination usually involves two separate but related specimens. The first is the cytological preparation of bone marrow cells obtained through bone marrow aspiration, thereby allowing excellent visualization of cell morphology and detailed quantification of marrow cellular elements. The second specimen is a needle biopsy of the bone and associated marrow, which allows optimal evaluation of bone marrow cellularity, fibrosis, infection, or infiltrative disease. Bone marrow aspiration is important for the evaluation of hematologic and some non hematologic diseases, for example, most myelo- and lymphoproliferative disorders cannot be diagnosed without bone marrow aspiration; specific morphological features (e.g. dysplasia or nuclear asynchrony) can be assessed. Atypical cells (leukemia cells and lymphoma or carcinoma cells) can be recognized and further classified based on cytochemistry. Iron deposits in the bone marrow can be checked with special staining. Bone marrow aspiration is usually performed on the posterior iliac crest, anterior iliac crest, tibia and sternum. Bone marrow aspiration yields samples for cytomorphology, cytogenetics, surface markers, and molecular studies.

#### **Pendahuluan**

Pemeriksaan darah tepi dan pemeriksaan laboratorium rutin lainnya tidak selalu memberikan informasi yang cukup untuk diagnosis penyakit hematologi. Pada beberapa

pasien, pemeriksaan mikroskopis langsung pada sumsum tulang diperlukan untuk memastikan dugaan diagnosis klinis atau untuk memantau jalannya terapi medis.<sup>1</sup> Pemeriksaan sumsum tulang memiliki penerapan luas dalam manajemen klinis. Aspirasi sumsum tulang (*bone marrow aspiration* = BMA) adalah prosedur invasif sederhana yang relatif aman. Pemeriksaan ini dilakukan secara rutin di rumah sakit, meskipun pada kondisi trombositopenia berat. Pemeriksaan sumsum tulang merupakan pemeriksaan yang penting dan sederhana untuk mendiagnosis penyakit hematologi dan non-hematologis serta untuk evaluasi progresi penyakit.<sup>2,3</sup> Aspirasi dan biopsi *trephine* sumsum tulang merupakan pemeriksaan penting tidak hanya untuk diagnosis hematologis tetapi juga untuk berbagai penyakit sistemik, seperti demam tanpa penyebab yang jelas, penyakit granulomatos, storage diseases, sindrom hemofagositik, histiocytosis, leishmaniasis, dan bahkan malaria yang tidak responsif terhadap pengobatan dapat didiagnosis melalui pemeriksaan ini.<sup>3</sup>

Teknik pemeriksaan sumsum tulang dapat berupa aspirasi dan/atau biopsi *trephine*. Sediaan aspirasi sumsum tulang bermanfaat untuk penghitungan jumlah sel diferensial dan evaluasi morfologi sel individual, sedangkan biopsi *trephine* lebih bermanfaat untuk evaluasi selularitas sumsum tulang, penentuan jumlah megakariosit secara akurat, dan deteksi lesi fokal seperti limfoma, granuloma, dan karsinoma metastatik.<sup>1,4</sup> Spesimen aspirasi dan biopsi memberikan informasi yang saling melengkapi. Dokter yang berpengalaman akan dapat melakukan pemeriksaan sumsum tulang dengan rasa sakit dan ketidaknyamanan yang minimal.<sup>1</sup> Meskipun aspirasi dan biopsi sumsum tulang aman, teknik ini harus dilakukan dengan indikasi yang tepat sehingga hasilnya akan dapat membantu menegakkan diagnosis atau memberikan tindak lanjut pengobatan.<sup>4</sup>

Melakukan aspirasi atau biopsi sumsum tulang merupakan prosedur invasif dan berpotensi menimbulkan rasa sakit, dan oleh karena itu, prosedur ini harus dievaluasi secara cermat sebelum dilakukan. Pada makalah ini, selain bahasan mengenai teknik aspirasi sumsum tulang dan pembuatan serta pewarnaan preparat, juga dibahas mengenai sumsum tulang dan hematopoiesis secara umum, indikasi dan kontraindikasi, dan piffall dari pemeriksaan aspirasi sumsum tulang. Diharapkan agar dapat meningkatkan pemahaman mengenai pemerksaan sumsum tulang, dalam hal ini BMA.

### **Hematopoiesis di dalam Sumsum Tulang**

Sumsum tulang merupakan salah satu organ tubuh yang terbesar, mencakup 3% hingga 6% dari berat badan dan beratnya 1500 g pada orang dewasa. Sulit untuk

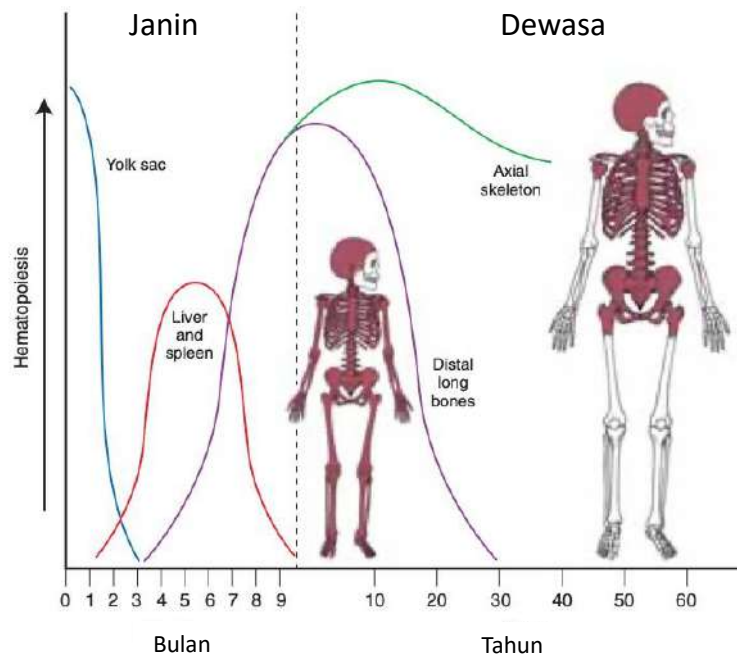
mengkonseptualisasikan sumsum tulang sebagai suatu organ, karena sumsum tulang bukanlah sebuah organ. organ padat yang mudah disentuh, diukur, atau ditimbang. Selain itu, jaringan sumsum tulang tersebar ke seluruh tubuh.<sup>5</sup> Sumsum tulang adalah jaringan ikat sangat seluler yang mengisi rongga meduler tulang. Sumsum tulang mengisi ruang antara trabekula tulang di rongga sumsum. Sumsum tulang lunak dan rapuh/gembur dan mudah disedot atau dibiopsi dengan jarum. Jaringan ikat ini terdiri dari sel hemopoietik, jaringan adiposa sumsum tulang dan sel stroma penyokong. Saat lahir, semua tulang mengandung jaringan hematopoietik. Sel-sel lemak mulai menggantikan sumsum tulang hematopoietik di ekstremitas pada tahun ke lima hingga ke tujuh. Pada masa dewasa, sumsum tulang hematopoietik terbatas pada kerangka aksial dan bagian proksimal ekstremitas. Sumsum tulang lemak tampak kuning, sedangkan sumsum tulang hematopoietik berwarna merah. sumsum merah juga mengandung lemak, dan tetesan lemak terlihat jelas pada spesimen sumsum yang diaspirasi. Secara histologis, sumsum kuning hampir seluruhnya terdiri dari sel-sel lemak dan jaringan ikat penyokong. Sumsum merah mengandung banyak sel hematopoietik, sel lemak, dan jaringan ikat.<sup>4,6</sup> Sumsum merah secara aktif terlibat dalam produksi sel darah dan mewakili sumsum aktif atau hematopoietik. Sumsum kuning (lemak) tidak aktif, dan komponen seluler utamanya adalah sel lemak.<sup>3,4</sup> Diferensiasi dan pematangan progresif sel induk primitif menghasilkan tipe sel sumsum tertentu, yaitu myeloid (leukosit), eritrosit, dan megakariosit (trombosit).<sup>3,5</sup> Pada 18 tahun pertama kehidupan, sumsum tulang tersebar ke seluruh tulang utama kerangka, terutama tulang panjang. Secara bertahap, seiring perkembangan tubuh, sumsum tulang digantikan oleh lemak hingga lokasi utama sumsum tulang pada orang dewasa adalah krista iliaka, yang terletak di daerah panggul dan tulang sternum.<sup>5</sup>

Penyakit hematologis dan nonhematologis yang mengenai sumsum tulang dapat menyebar secara primer atau sekunder ke sumsum tulang. Dalam kedua kasus tersebut, arsitektur sel sumsum tulang yang normal rusak atau tergeser. Pola kelainan yang mempengaruhi sumsum tulang di negara-negara berkembang sangat berbeda dibandingkan di negara-negara maju. Pada sebagian besar kasus, diagnosis dapat ditegakkan berdasarkan riwayat penyakit yang terperinci, pemeriksaan fisik, dan beberapa pemeriksaan penunjang sederhana. Namun pada kasus tertentu diperlukan pemeriksaan sumsum tulang untuk penegakan diagnosis.<sup>3</sup>

Hematopoiesis didefinisikan sebagai produksi, pengembangan, diferensiasi, dan pematangan semua sel darah. Di dalam struktur dasar sumsum tulang terdapat mekanisme untuk melakukan hal tersebut:

1. Terus-menerus menyuplai sirkulasi perifer dengan sel-sel dewasa.
2. Memobilisasi sumsum tulang untuk meningkatkan produksi jika kondisi hematologi memerlukannya.
3. Mengkompensasi penurunan hematopoiesis dengan menyediakan tempat hematopoietik di luar sumsum tulang (tempat non-sumsum tulang, hati dan limpa).

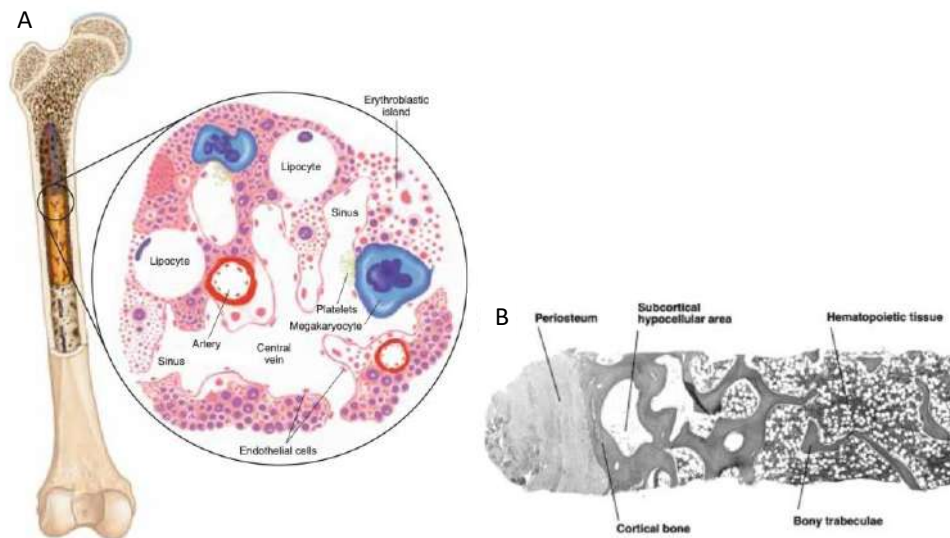
Berbagai organ berperan dalam hematopoiesis, dan organ-organ ini berbeda dari janin hingga orang dewasa (Gambar 1).<sup>5</sup>



**Gambar 1. Hematopoiesis pada Janin (Kiri) dan Dewasa (Kanan)**

(Ciesla, Hematology in Practice, 2007).

Hematopoiesis di dalam sumsum tulang disebut hematopoiesis intramedular. Istilah hematopoiesis ekstramedular menggambarkan hematopoiesis di luar lingkungan sumsum tulang, terutama hati dan limpa. Karena hati dan limpa berperan utama dalam hematopoiesis awal janin, organ-organ ini mempertahankan memori dan kemampuan hematopoietiknya. Hati dan limpa dapat berfungsi sebagai organ hematopoiesis jika diperlukan pada masa dewasa.<sup>5</sup>



**Gambar 2.** A. Struktur Internal sumsum tulang. (Ciesla, Hematology in Practice, 2007). B. Komponen struktur tulang (biopsi, pengecatan HE, pembesaran objektif 40x) (Riley *et al.*, Journal of Clinical Laboratory Analysis, 2009, 23: 259-307)

**Tabel 1. Komponen Sumsum Tulang Normal.<sup>7</sup>**

Component	Comment
Bone	Cortex of dense bone. Trabeculae of lamellar bone. Osteoblasts and osteoclasts along endosteal surface
Stroma	
Vessels	Small arteries, capillaries, and venous sinusoids. Sinusoids are normally thin-walled, collapsed, and inconspicuous
Reticulin and fibroblasts	Fine reticulin fibers form supporting network throughout marrow. Produced by fibroblasts. Most prominent around vessels
Adipose tissue	Increases with age, most prominent in subcortical region
Hematopoietic tissue	
Granulocytic series	Predominant marrow cell type except very early in life. Least mature forms normally along endosteal surface and around small arteries, most mature forms in intertrabecular region
Erythrocytic series	Normally organized into small groups (erythroid islands) associated with a macrophage
Megakaryocytic series	Mature forms are largest cells in body. Non-clustered, scattered, usually adjacent to venous sinusoids
Lymphocytes	Comprise up to 50% of marrow cells in infants and young children. Small, inconspicuous, may form small clusters
Plasma cells	Occur individually or in clusters of 2–3 cells. Most conspicuous around capillaries. Polyclonal
Mast cells	Few in normal bone marrow
Macrophages	Frequently occur in association with erythroid precursors

### **Pemeriksaan sumsum tulang**

Aspirasi sumsum tulang adalah metode yang berguna untuk mempelajari morfologi sel hematopoietik, rasio Mieloid : Eritroid, dan infiltrasi keganasan tertentu.<sup>2,8</sup> Aspirasi sumsum tulang dapat digunakan untuk sitogenetika, flowsitometri, dan genetika molekuler. Interpretasi BMA dipengaruhi beberapa faktor, antara lain, pewarnaan khusus untuk membedakan berbagai jenis leukemia akut, imunositokimia untuk mendiagnosis leukemia akut dan limfoma. Pemeriksaan spesimen sumsum tulang telah banyak digunakan untuk penegakan diagnosis dan penentuan stadium banyak kelainan hematologi. Investigasi sumsum tulang dapat membantu mendiagnosis dugaan penyakit hematologi. Distribusi penyakit hematologi dan non hematologi berbeda di negara berkembang dengan di negara maju.<sup>2,9,10</sup>



Pembuatan preparat yang berkualitas juga menentukan evaluasi, identifikasi dan interpretasi hasil pemeriksaan. Umumnya aspirasi sumsum tulang dilakukan untuk diagnosis sitopenia yang tidak diketahui penyebabnya, dan keganasan seperti leukemia.<sup>2,6</sup> Meskipun merupakan pemeriksaan yang invasif, namun aspirasi sumsum tulang relatif aman, dan bahkan dapat dilakukan pada pasien rawat jalan.<sup>2</sup>

### 1. Indikasi

Aspirasi dan biopsi trephine sumsum tulang memberikan informasi yang berguna dan saling melengkapi. Direkomendasikan agar aspirasi dan biopsi sumsum tulang dilakukan secara rutin sehingga temuan masing-masing dapat dikorelasikan. Namun, dalam beberapa situasi klinis, aspirasi sumsum tulang saja sudah cukup. Jika dengan aspirasi tidak dapat diperoleh spesimen ('dry tap'), harus disiapkan *imprints trephine*.<sup>6,11</sup> Berikut indikasi pemeriksaan sumsum tulang (Tabel 2):

**Tabel 2. Indikasi Pemeriksaan Sumsum Tulang.**<sup>11</sup>

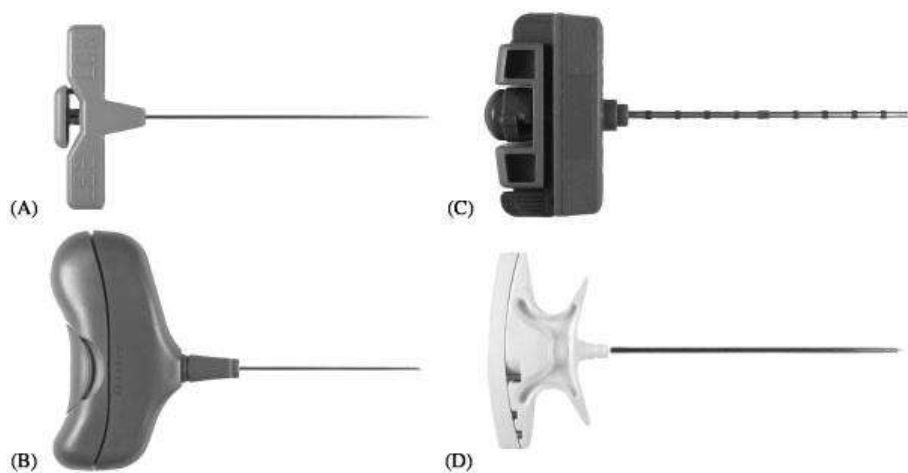
- 
- Investigasi anemia yang tidak diketahui penyebabnya, indeks eritrosit abnormal, sitopenia, atau sitosis
  - Investigasi morfologi apusan darah tepi abnormal yang menunjukkan patologi sumsum tulang
  - Diagnosis, penentuan stadium, dan tindak lanjut kelainan hematologi ganas (misalnya leukemia akut dan kronis, sindrom mielodisplastik, kelainan mieloproliferatif kronik, limfoma, mieloma sel plasma, amiloidosis, mastositosis)
  - Investigasi dugaan metastasis sumsum tulang
  - Lesi tulang fokal yang tidak dapat dijelaskan pada pencitraan radiologi
  - Organomegali yang tidak dapat dijelaskan atau adanya lesi massa yang tidak dapat dilakukan biopsi
  - Kultur mikrobiologi untuk investigasi demam yang tidak diketahui asalnya atau infeksi tertentu, misalnya, tuberkulosis militer, leishmaniasis, malaria
  - Evaluasi simpanan besi
  - Investigasi gangguan penyimpanan lipid/glikogen
  - Eksklusi penyakit hematologis pada calon donor transplantasi sel induk alogenik
- 

### 2. Peralatan aspirasi sumsum tulang

Peralatan:

- Vacutainer dengan antikoagulan K EDTA
- Lidokain 1-2%
- Spuit disposable 3 cc dan 5 cc, jarum 25 gauge
- Kapas alkohol (isopropil alkohol 70%)

- Povidon iodine
- Kassa steril
- Jarum BMA 14 atau 18 gauge
- Sduit dispossible 10 cc/20 cc
- Kaca objek
- Spidol marker
- Sarung tangan
- Doek steril
- Gown APD



**Gambar 3.** Jarum aspirasi dan biopsi sumsum tulang. A: Lee Lok bone marrow aspirate needle (Lee Medical Ltd., Minneapolis, MN); B: Iliac crest bone marrow aspiration needle with ergonomic handle (Allegiance Healthcare Corp., McGaw Park, IL); C: SNARECOIL bone marrow biopsy needle (Ranfac Corp., Avon, MA); D: Isan disposable needle for bone marrow biopsy (Gallini, Mirandola, Italy). (Riley *et al.*, *Journal of Clinical Laboratory Analysis* 18:70–90, 2004).



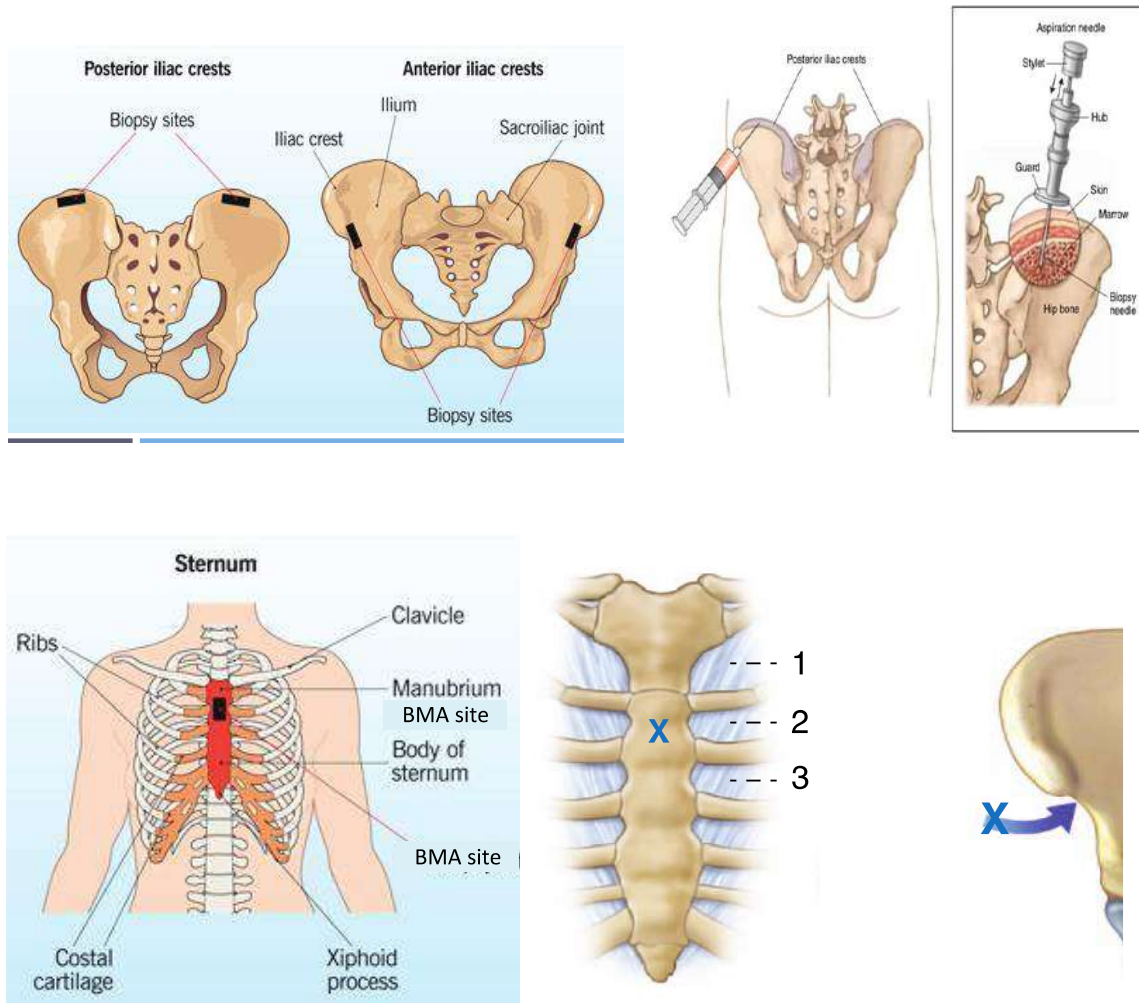
**Gambar 4. Peralatan Aspirasi Sumsum Tulang (koleksi pribadi)**

### 3. Lokasi

Lokasi pilihan untuk aspirasi dan biopsi trephine sumsum tulang adalah krista iliaka posterior. Krista iliaka anterior dapat digunakan jika pasien tidak dapat bergerak. Permukaan medial tibia juga dapat digunakan pada bayi. Aspirasi sternal mungkin sesuai pada keadaan tertentu, misalnya, jika pasien tidak dapat bergerak, telah menerima radioterapi pada panggul atau tempat lain 'dry tap' atau jika biopsi *trephine* tidak diperlukan. Aspirasi sternal hanya boleh dilakukan oleh operator berpengalaman yang memahami risiko tamponade jantung. Perlu dicatat bahwa aspirasi sternal tidak boleh dilakukan pada pasien dengan dugaan myeloma sel plasma atau kelainan lain yang berhubungan dengan resorpsi tulang.<sup>6,11</sup>

Pada pasien dewasa, krista iliaka posterior merupakan lokasi pilihan. Area tersebut dianestesi dengan anestesi lokal selama jangka waktu tertentu dan dokter melanjutkan memasukkan jarum aspirasi dengan gerakan memutar ke bawah. Begitu jarum sudah masuk ke dalam sumsum tulang, posisinya akan kokoh dan tidak bisa digerakkan. Stylet dilepas dan spuit dipasang di pangkal jarum. Dengan gerakan cepat diperoleh sedikit cairan berdarah (kurang lebih 1 ml) dan bahan spikula sumsum tulang. Teknolog/teknisi menilai sampel sumsum tulang, mengkomunikasikan kepada dokter, dan kemudian menyiapkan slide dari bahan aspirasi, mengambil spikula sumsum tulang dengan loop atau pipet mikrobiologis. Pasien dengan jumlah trombosit yang menurun

mungkin perlu diawasi lebih ketat dan diberikan tekanan pada lokasi biopsi dalam jangka waktu yang lebih lama setelah prosedur selesai.<sup>5</sup>



**Gambar 5. Lokasi Aspirasi Sumsum Tulang.** (Lancet Laboratories, 2019; Ciesla, Hematology in Practice, 2007; dan Reddy and Morlote, Williams Hematology, 2021)

#### 4. Prosedur

Penting bagi operator untuk mengetahui indikasi klinis pemeriksaan sumsum tulang dan spesimen yang perlu diambil. Operator juga harus memahami perlunya sedasi dan analgesia yang memadai, dan masalah keamanan sehubungan dengan risiko trombositopenia atau koagulopati. Pertimbangan khusus mengenai lokasi pemeriksaan sumsum tulang dan posisi pasien harus diberikan kepada pasien yang *immobile*, obesitas, anak atau bayi, pasien dengan lesi tulang litik atau nekrosis sumsum tulang, atau yang

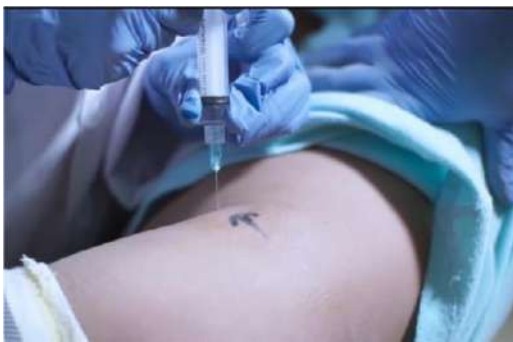
pernah menjalani radioterapi sebelumnya. Sebelum pemeriksaan BMA sebaiknya dilakukan hal-hal sebagai berikut:

- Prosedur harus dijelaskan secara rinci kepada pasien. Riwayat klinis pasien sebelumnya harus didokumentasikan dan setiap premedikasi dijelaskan.
- Informed consent harus diperoleh dari pasien.
- Pemeriksaan darah lengkap dan apusan harus dilakukan jika belum diambil pada 2 hari sebelumnya.<sup>1,11</sup>

Prosedur: <sup>13,14,15</sup>

1. Lakukan *informed consent*.
2. Pasien dipersilahkan untuk berbaring.
3. Cari lokasi BMA: bayi dan anak usia < 1 tahun di tibia bagian medial bawah tuberositas tibiae, anak-anak di Spina Iliaca Posterior Superior (SIPS) atau SIAS, dan dewasa di SIAS, SIPS atau Sternum.
4. Lakukan disinfeksi kulit dengan povidon iodine diamkan selama 1 menit, kemudian dilanjutkan dengan alkohol 70% dan biarkan kering selama 30 detik.
5. Lakukan anestesi lokal dengan lidokain mulai subkutan kemudian dilanjutkan ke periosteum, tunggu 3-5 menit.
6. Tusuk kulit dengan jarum BMA dan sampai ke periosteum, lanjut ke ruang sumsum tulang dengan gerakan memutar sampai jarum tertancap kuat di tulang, dengan posisi tegak lurus. Teruskan penusukan perlahan-lahan ke bawah periosteum, perlahan-lahan diputar dengan tekanan seperti mengebor. Penurunan resistensi, jarum dapat berdiri tegak, biasanya menunjukkan masuknya ke dalam cavum medulare (rongga sumsum tulang).
7. Lepaskan stilet dan pasang spuit 10-20 ml ke needle hub. Lakukan aspirasi/suction kuat untuk mendapatkan 0,2 ml hingga 2 ml sumsum tulang, lepaskan spuit dari jarum dan, jika diperlukan, pasang kembali stilet. Apabila diperlukan pemeriksaan lain bisa diaspirasi lagi 3-5 ml. Tutup luka.
8. Segera teteskan dengan cepat pada kaca objek yang diletakkan miring dan masukkan dalam tabung K EDTA.
9. Ambil segera bagian yang terdapat partikel sumsum tulang, segera pula buat 6 buah preparat apusan dan 2 buah preparat imprint/squash.
10. Biarkan kering di udara.
11. Dokumentasikan prosedur dan setiap masalah yang mungkin dihadapi pasien.

12. Pantau pasien dan lokasi pungsi, kurang lebih 30 menit.
13. Jika terjadi perdarahan berkepanjangan, periksa jumlah trombosit, *internasional normalized ratio* (INR) dan *activated partial thromboplastin time* (aPTT).
14. Instruksikan pasien atau keluarga untuk tidak menggunakan ibuprofen atau asam asetilsalisilat untuk nyeri di lokasi penusukan (dapat menyebabkan disfungsi trombosit).
15. Instruksikan untuk melepas/mengganti plester penutup luka dalam waktu kurang dari 12 jam.



**Gambar 6. Aspirasi Sumsum Tulang pada SIAS:** Penentuan lokasi, anestesi lokal, pungsi dan aspirasi (koleksi pribadi).

Pasca tindakan: <sup>13,14,15</sup>

1. Tekan daerah bekas tusukan dengan kassa steril yang diberi betadine selama  $\pm$  3- 5 menit.
2. Beri identitas pada apusan darah dengan pensil tumpul.



3. Kemudian lakukan pewarnaan Wright dan Prussian Blue.
4. Buang jarum dan bahan yang sudah tidak terpakai pada wadah yang telah ditentukan.
5. Buang bahan yang sudah terpakai pada tempat sampah medis.
6. Lepaskan sarung tangan, buang ke tempat sampah medis.
7. Cuci tangan sesuai dengan 6 langkah cuci tangan.

BMA pada anak < 1 tahun: <sup>13,14,15</sup>

Penilaian pasien.

1. Periksa diagnosis primer dan protokol pengobatan untuk menentukan kebutuhan pemeriksaan dan persyaratan khusus (misalnya, flow cytometry, cytogenetic atau molekuler lain);
2. Persetujuan tertulis dari wali/orang tua atau anak, jika dianggap kompeten;
3. Kaji kebutuhan sedasi;
4. Periksa jumlah trombosit, INR dan aPTT jika pasien memiliki riwayat perdarahan atau sedang dalam terapi antikoagulan;
5. Kaji kulit di lokasi pungsi untuk tanda-tanda infeksi;
6. Periksa rekam medis untuk riwayat alergi terhadap anestesi lokal, iodium atau obat anestesi;
7. Pastikan semua personel yang diperlukan hadir (misalnya, teknisi laboratorium jika pemeriksaan sitogenetik diperlukan);
8. Konfirmasi identitas pasien;
9. Pertimbangan penggunaan krim anestesi topikal 30 - 60 menit sebelum prosedur.

Persiapan

1. Posisikan bayi terlentang.
2. Pastikan bahwa bayi diimobilisasi dengan tepat dan jalan napas tidak terganggu.
3. Bersihkan kulit; palpasi dan temukan lokasi aspirasi.
4. Cuci tangan dan menggunakan APD sesuai untuk prosedur steril.
5. Buka peralatan yang diperlukan dengan teknik steril.
6. Disinfeksi tempat tusukan dengan larutan antiseptik dengan gerakan melingkar dari bagian dalam ke luar (rekomendasi: 3x).

7. Bius lokasi penusukan dengan 1 - 2 ml anestesi lokal (lidokain 1% - 2% tanpa adrenalin).
8. Injeksi awal larutan anestesi harus subkutan, kemudian secara perlahan menyuntikkan lebih dalam sampai ke periosteum. Di beberapa institusi, injeksi subkutan tidak diperlukan jika anestesi topikal telah diberikan.



**Gambar 7. Aspirasi Sumsum Tulang pada Tibia: Penentuan lokasi dan anestesi lokal**  
(koleksi pribadi)





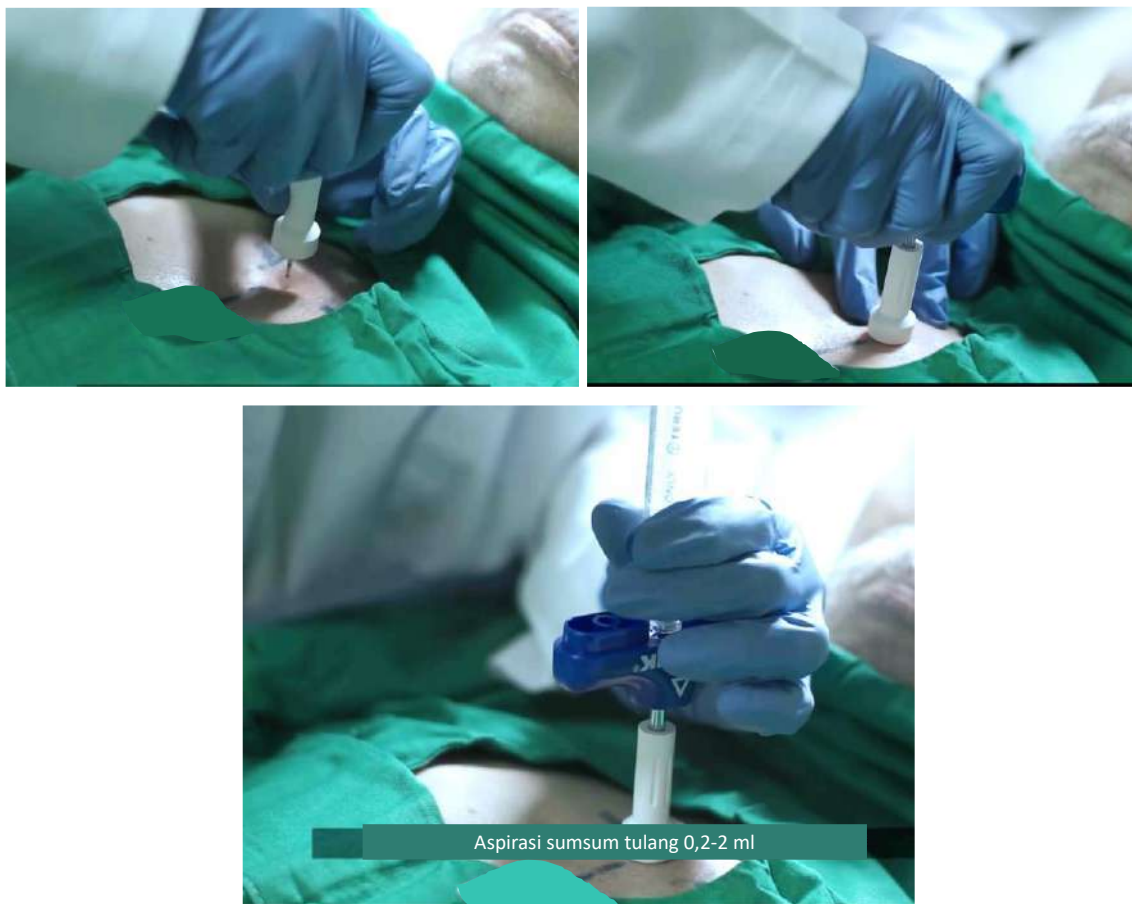
**Gambar 8.** Aspirasi sumsum tulang pada tibia: menggunakan jarum pediatrik (koleksi pribadi).

### **Aspirasi Sumsum Tulang pada Sternum**

Aspirasi sumsum tulang pada sternum dilakukan pada bagian pertama body/corpus sterni, setinggi ruang interkostal ke dua atau ke tiga, pada garis tengah. Aspirasi dari bagian bawah sternum meningkatkan risiko komplikasi. Aspirasi sternum lebih berisiko pada usia berapa pun, dan kontraindikasi pada anak kecil. Aspirasi sumsum tulang dari sternum biasanya dilakukan hanya jika krista iliaka posterior dan anterior sakit atau tidak dapat diakses karena obesitas masif. Selain komplikasi yang jarang, tetapi tetap ada risiko tembus mediastinum, jika tidak dilakukan dengan teknik yang benar. Tulang sternum adalah tempat yang tidak sesuai untuk biopsi. Jarum aspirasi sumsum tulang yang digunakan adalah jenis "Illinois" dengan pelindung sternal (*guard*). Ketebalan subkutan ditentukan selama induksi anestesi lokal, dan pelindungnya disesuaikan, maksimal 5 mm.<sup>6,11</sup>



**Gambar 9. Aspirasi Sumsum Tulang pada Sternum:** Penentuan lokasi dan anestesi (koleksi pribadi)



**Gambar 10. Aspirasi Sumsum Tulang pada Sternum:** menggunakan jarum Illinois dengan guard (koleksi pribadi).

Baik aspirasi maupun biopsi trephine dapat dilakukan terlebih dahulu. Jika aspirasi dilakukan terlebih dahulu, biopsi *trephine* harus dilakukan melalui sayatan yang sama, kira-kira 0,5 - 1 cm dari tempat aspirasi untuk menghindari biopsi *trephine* yang rusak atau hemoragik. Jika biopsi *trephine* dilakukan terlebih dahulu, jarum aspirasi

harus ditempatkan pada permukaan tulang kira-kira 0,5 - 1 cm dari lokasi biopsi, untuk menghindari pembekuan aspirasi. Direkomendasikan agar aspirasi dan biopsi trephine dilakukan dengan menggunakan jarum secara terpisah, dan tidak dengan jarum trephine. Jika aspirasi dilakukan dengan jarum *trephine*, sampel aspirasi mungkin akan mengalami hemodilusi. Jika biopsi kemudian dilakukan dengan menggunakan jarum yang sama, inti *trephine* mungkin rusak atau mengalami pendarahan.<sup>11</sup>

## 5. Pengumpulan Spesimen Aspirasi

Metode pengumpulan dan penanganan spesimen aspirasi sumsum tulang dan biopsi trephine diuraikan pada Tabel 3. Direkomendasikan agar aspirasi diambil dengan spuit 10 atau 20 ml, untuk memberikan tekanan negatif yang memadai. Untuk menjaga morfologi, jarum spuit tidak boleh mengandung antikoagulan. Sekitar 0,5 ml pengambilan aspirasi pertama harus dikumpulkan untuk membuat apusan sumsum tulang di samping tempat tidur. Dengan meningkatnya volume aspirasi BM yang diambil, terjadi pengenceran aspirasi dengan darah perifer secara progresif. Aspirasi tambahan harus ditempatkan ke dalam tabung yang mengandung asam etilen diamina tetra-asetat (EDTA), jika sampel menggumpal dengan cepat. Jumlah aspirasi harus sesuai dengan jumlah EDTA di dalam tabung untuk meminimalkan artefak yang diinduksi EDTA. Untuk sampel darah tepi, ICSH merekomendasikan garam dipotassium EDTA dengan konsentrasi  $1,50 \pm 0,25$  mg/ml darah (ICSH, 1993). Volume aspirasi yang sesuai dapat ditambahkan ke tabung yang berisi larutan EDTA isotonik untuk mencapai konsentrasi EDTA yang diinginkan. Sebagai alternatif, volume aspirasi yang sesuai dapat ditambahkan ke tabung EDTA pediatrik.<sup>6,11</sup>

Jarum spuit ke dua harus dipasang pada jarum aspirasi untuk mengambil sampel tambahan untuk tes tambahan, seperti *flow cytometry*, analisis sitogenetik dan studi genetika molekuler, mikrobiologi, mikroskop elektron atau kultur sumsum tulang. Jika terjadi dry tap, atau jika tidak ada partikel ('fragmen') yang diperoleh, aspirasi sumsum tulang dapat diulangi pada sudut yang sedikit berbeda atau pada lokasi lain. Disarankan agar sampel untuk flow sitometri, sitogenetika, dan studi genetika molekuler dikumpulkan dengan semua aspirasi sumsum tulang. Sampel dapat dibuang jika pemeriksaan lanjutan tidak diperlukan.<sup>11</sup>

**Tabel 3. Pengumpulan dan Pemrosesan Aspirat dan Spesimen Biopsi Sumsum Tulang** (Lee *et al*, Int. Jnl. Lab. Hem. 2008,30, 349–364)

Spesimen	Pemeriksaan	antikoagulan atau media	Fiksasi	Pemrosesan selanjutnya	Pengecatan (jumlah preparat)*
Aspirat	Apusan (6 preparat)	Tanpa/EDTA	Udara kering, metanol	-	Pewarnaan MGG atau Wright (2 slide),
Aspirat	Squash (>=2 preparat)	Tanpa/EDTA	Udara kering, metanol	-	Prussian Blue (1 slide), sitokimia.
Aspirat	Bekuan partikel	-		Paraffin embed, cut sections	Pewarnaan MGG atau Wright (1 slide) Prussian Blue (1 slide).
Aspirat	Flow cytometry	Heparin	NBF, AZF, B5, Bouin's dll		H&E (3 bagian),
Aspirat	Genetik molekular Sitogenetik,	EDTA	Pemrosesan lebih lanjut sesuai protokol		Giemsa, IHC, histokimia, FISH
Aspirat	FISH	Media kultur jaringan steril, mis. RPMI dengan 10% serum janin sapi			
Aspirat	Mikrobiologi	Tabung steril atau tabung heparinisasi, tabung sentrifugasi lisis atau media			

Core biopsy	Histologi	kultur -		Dekalsifikasi, tempelkan parafin, potong bagian	
Core biopsy	Touch imprint (>=2 preparat)	-	NBF, AZF, B5, Bouin's dll  Udara kering, metanol	-	H&E (2-4 bagian), retikulin (1 bagian), Giemsa, IHC, histokimia, FISH  Pewarnaan MGG atau Wright (1 slide), sitokimia

## 6. Persiapan Slide Aspirasi

Kualitas spesimen merupakan hal yang penting dalam interpretasi spesimen sumsum tulang. Interpretasi diagnostik hanya dapat dilakukan jika sel-sel secara morfologi intak (utuh), terdapat dalam jumlah yang representatif dari sumsum tulang. Aspirat sumsum tulang seharusnya mengandung beberapa partikel, di mana masing-masing terdapat bagian "trail" yang tercatat dengan baik, sehingga secara morfologi dapat diidentifikasi. Masalah yang lazim terjadi adalah dilusi aspirat sumsum tulang oleh darah tepi, mengakibatkan kekurangan partikel dan prekursor hematopoietik. Aspirat juga bisa sangat tebal, pengecatan buruk, atau dibuat dengan penekanan yang berlebihan, sehingga mayoritas sel hancur dan tidak dikenali secara morfologi.<sup>7</sup>

Apusan dari pasien dengan leukemia akut seringkali memiliki sel yang melimpah dan ketebalan apusan dapat menghambat evaluasi morfologi. Area-area adekuat terkadang dapat ditemukan pada bagian tepi apusan; jika tidak, apusan tambahan seyogyanya dicat. Apusan tambahan dapat dibuat dari alikuot sumsum tulang dengan antikoagulan heparin. Pilihan-pilihan lain bisa dari apusan dari sumsum tulang yang didilusi, buffy coat, hasil sentrifugasi *Ficoll-Hypaque* atau media lain.<sup>7</sup>

Apusan sumsum tulang harus dibuat segera setelah aspirasi. Apusan yang dibuat dari sampel EDTA harus dibuat sesegera mungkin untuk mengurangi artefak. Untuk menyiapkan apusan, aspirasi harus dikeluarkan ke dalam piring plastik kecil atau kaca bersilikon, dan pipet Pasteur digunakan untuk mengambil partikel, yang ditempatkan pada kaca objek dan kemudian dibuat apusan. Sebagai alternatif, setetes aspirasi dapat diteteskan pada masing-masing kaca objek dan kelebihan darah dikeluarkan dari kaca objek dengan membalikkan kaca objek, atau disedot dengan pipet Pasteur atau spuit plastik, sebelum membuat sediaan apus.<sup>1,11</sup>

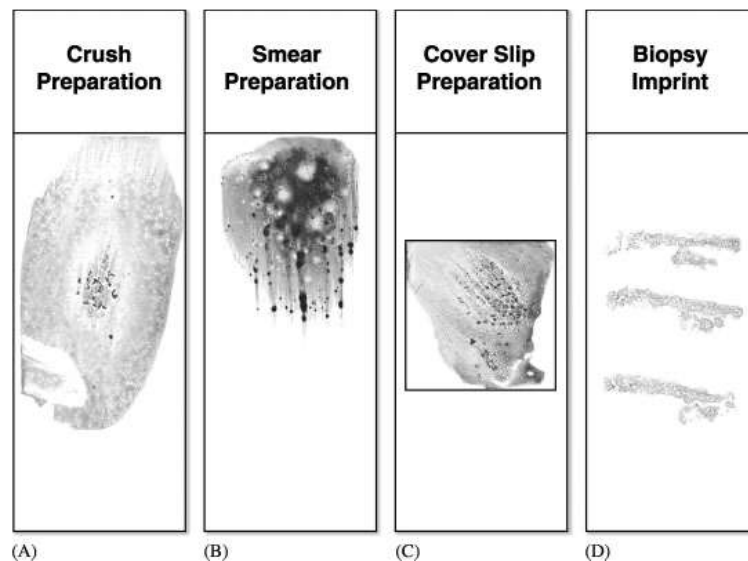


**Gambar 11. Pembuatan Preparat dari Aspirasi Sumsum Tulang** (koleksi pribadi).

Apusan dibuat dengan alat spreader kaca dengan tepi miring sehingga lebar alat spreader lebih sempit dari lebar kaca objek. Spreader ditempatkan di depan tetesan aspirasi dengan sudut kira-kira 30° dan ditarik ke belakang hingga bersentuhan dengan tetesan, agar tetesan dapat menyebar sepanjang garis kontak dengan kaca objek. Spreader kemudian didorong ke depan dengan gerakan halus, bersentuhan dengan slide. Harus dibuat minimal enam apusan dan dua preparasi kaca objek *squash* ('crush'). Untuk membuat slide *squash*, setetes partikel yang mengandung partikel ditempatkan di tengah slide yang satu, dan slide ke dua ditempatkan di atas slide pertama. Berat slide ke dua



pada slide pertama cukup untuk menghancurkan partikel sumsum tulang; tidak ada gaya ke bawah yang harus diterapkan. Slide-slide tersebut ditarik menjauh satu sama lain, searah dengan sumbu panjang slide. Sediaan apusan dan *squash* sumsum tulang harus diberi label di samping tempat tidur dengan nama belakang dan nama depan atau inisial, identitas unik pasien, dan tanggal. Slide kaca harus berupa kaca buram (*frosted*) di salah satu ujungnya sehingga identitas pasien dapat ditulis dengan pensil.<sup>1,11</sup>



**Gambar 12. Apusan dari Aspirasi Sumsum Tulang;** A: preparat “crush” konvensional yang dibuat dengan dua kaca objek; B: preparat “Smear”/apusan; C: preparat dengan cover glass/coverslip; D: imprint dari biopsi (preparat “touch”). (Riley *et al.*, *Journal of Clinical Laboratory Analysis* 18:70–90, 2004).

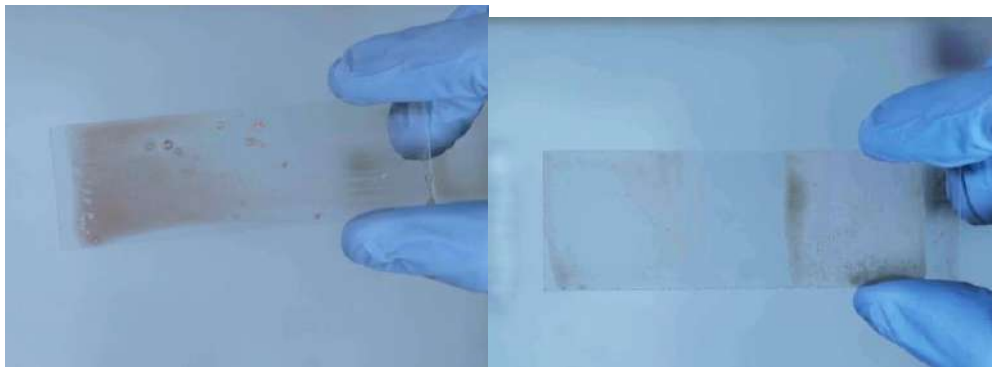
#### Preparat apusan

- Apusan aspirasi sumsum tulang dapat dibuat langsung atau dari lapisan *buffy coat* sampel aspirasi dengan antikoagulan K EDTA.
- *International Committee for Standardization in Hematology (ICSH)* merekomendasikan penggunaan dua jenis preparat untuk pemeriksaan di bawah mikroskop: *Wedge-spread film & crush film/touch preparations/imprints*.
- Partikel sumsum tulang dapat diidentifikasi secara kasar dari *crush preparation* atau *touch imprints*.

- Apusan partikel/spikula sumsum tulang dan *droplets* lemak dapat divisualisasikan pada slide yang tidak diwarnai dengan mata telanjang, menjadi petunjuk sampel sumsum tulang, bahwa bukan darah tepi.

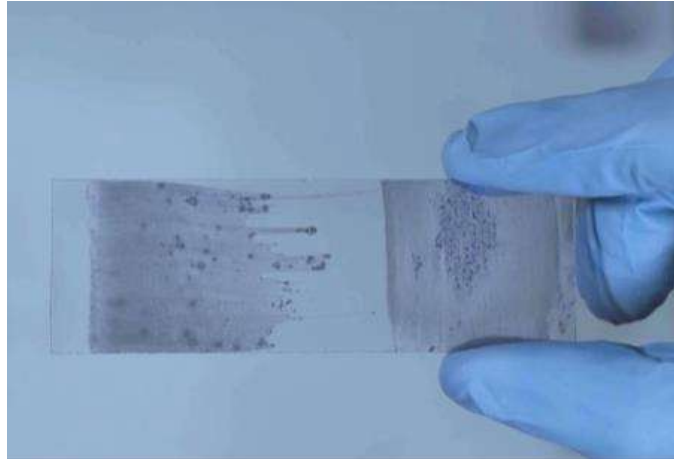


**Gambar 13. Spesimen dengan Partikel Sumsum Tulang di dalam Tabung dengan Antikoagulan K EDTA (koleksi pribadi).**



**Gambar 14. Preparat dari Spesimen Aspirasi Sumsum Tulang dengan Partikel yang Didapatkan, Sebelum Diwarnai (koleksi pribadi).**





**Gambar 15. Preparat dari Spesimen Aspirasi Sumsum Tulang dengan Partikel yang Didapatkan, Setelah Diwarnai dengan Wright (koleksi pribadi).**

### **7. Pewarnaan Slide Aspirasi**

Dua apusan yang dikeringkan di udara dan satu kaca objek harus difiksasi dengan metanol absolut segar bebas aseton dan diwarnai dengan pewarnaan Romanowsky, seperti Wright atau May-Grünwald-Giemsa (MGG) atau pewarnaan Wright Giemsa.<sup>6,11</sup> Smock, Lee. Semua preparat sumsum tulang harus ditutup dengan menggunakan media *mounting* yang cepat mengeras dan mengering. Media mounting mungkin mengandung senyawa organik beracun seperti toluena atau xilena dan harus ditangani dengan tindakan pencegahan keselamatan yang sesuai. Disarankan agar hal ini dilakukan di lemari asam kimia. Setelah pewarnaan, label kertas harus ditempelkan pada slide dengan rincian identitas pasien dan tanggal. Slide tambahan dapat digunakan untuk sitokimia (misalnya myeloperoksidase atau esterase nonspesifik), IHC, FISH, atau disimpan sebagai apusan yang tidak difiksasi dan tidak diwarnai, sesuai kebutuhan.<sup>11</sup>

Slide aspirasi sumsum tulang cadangan dapat dibungkus rapat dengan aluminium foil untuk disimpan pada suhu  $-20^{\circ}$  Celcius untuk mengawetkan antigen seluler. Dalam proses selanjutnya, bungkus tersebut tidak boleh dibuka sampai sudah hangat hingga mencapai suhu kamar, untuk mencegah kondensasi. Apusan aspirasi yang tidak difiksasi dan tidak diwarnai yang disimpan pada suhu kamar dalam jangka waktu lama dapat memberikan hasil yang bervariasi pada pewarnaan Giemsa retrospektif. Slide aspirasi yang difiksasi dalam metanol absolut mengawetkan DNA (dan mungkin banyak antigen) untuk FISH, atau ekstraksi DNA dan amplifikasi PCR jika diperlukan.<sup>11</sup>

## Pewarnaan khusus

Beberapa pewarnaan khusus dapat dilakukan pada apusan darah tepi, apusan aspirasi sumsum tulang, sediaan 'touch' sumsum tulang, dan bahan biopsi sumsum tulang, dan akan memberikan informasi tambahan tentang garis keturunan sel melebihi apa yang diperoleh dengan pewarnaan standar sederhana. Pewarnaan khusus umumnya terbagi dalam dua kategori: pewarnaan sitokimia yang menggunakan reaksi enzimatik seluler untuk memberikan pewarnaan dan pewarnaan imunositokimia yang mengidentifikasi epitop antigen spesifik sel. Pewarnaan ini sangat berguna dalam karakterisasi keganasan hematologi atau metastasis primer.<sup>6</sup>

### 1. Pewarnaan sitokimia

Pewarnaan sitokimia berguna dalam diagnosis dan klasifikasi leukemia akut, meskipun kegunaan ini telah dikurangi dengan identifikasi penanda spesifik lineage dengan flow cytometry. Pewarnaan ini memungkinkan identifikasi leukemia akut myeloid dan limfoid, serta memberikan satu dasar untuk subklasifikasi leukemia myeloid akut. Pewarnaan ini banyak digunakan dalam subklasifikasi morfologi, seperti sistem Perancis-Amerika-Inggris, namun penggunaannya telah menurun karena ketersediaan luas dari flow cytometry dan tes tambahan lainnya. Pewarnaan sitokimia biasanya dilakukan pada apusan darah tepi, aspirasi sumsum tulang, atau preparat sentuh yang dibuat dari biopsi sumsum tulang. Hasil terbaik diperoleh dengan menggunakan bahan yang baru diperoleh; namun, beberapa reaksi dapat dilakukan pada bahan yang berumur beberapa tahun.<sup>6</sup>

#### a. Mieloperoksidase

Granula primer neutrofil dan eosinofil sekunder mengandung mieloperoksidase. Granula lisosom monositik sedikit positif. Limfosit dan eritrosit berinti kekurangan enzim ini. Pewarnaan disebabkan oleh oksidasi substrat 3-amino-9-ethylcarbazole atau 4-chloro-1-naphthol oleh mieloperoxidase di dalam sel untuk membentuk endapan berwarna coklat.

Enzim mieloperoxidase sensitif terhadap cahaya, dan apusan harus segera diwarnai atau terlindung dari cahaya. Aktivitas enzimatik dalam sel dapat berkurang seiring berjalannya waktu, sehingga pewarnaan tidak boleh dilakukan pada apusan darah atau sumsum yang berumur lebih dari tiga minggu. Media pemasangan kaca penutup

permount (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA) dapat menyebabkan memudarnya noda. Myeloperoxidase juga sensitif terhadap perlakuan panas dan metanol. Sel eritroid dapat terwarnai oleh peroksidase setelah perlakuan metanol karena interaksi nonenzimatik antara reagen pewarnaan dan Hb (reaksi pseudoperoksidase atau Lepehne). Antibodi terhadap myeloperoxidase tersedia untuk analisis flow cytometry dan pewarnaan imunohistokimia pada bagian jaringan yang terfiksasi.<sup>6,16</sup>

#### b. Sudan black B

Sudan black B mewarnai lipid dan fosfolipid intraseluler. Pola pewarnaan sangat mirip dengan reaksi mieloperoxidase, dengan pewarnaan positif pada sel granulositik dan eosinofil, pewarnaan monositik lemah, dan tidak ada pewarnaan limfosit, meskipun beberapa hal positif dapat dilihat pada butiran limfoblas azurofilik. Sudan black B mempunyai keunggulan dibandingkan mieloperoxidase karena dapat digunakan untuk menodai apusan darah atau sumsum tulang yang lebih tua, dan warna tersebut tidak memudar seiring berjalannya waktu.<sup>6</sup>

#### c. Specific (Naftol AS-D Kloroasetat) Esterase

Pewarnaan esterase spesifik (naftol AS-D kloroasetat), juga disebut pewarnaan Leder, digunakan untuk mengidentifikasi sel-sel seri granulositik. Pewarnaan ini tidak mewarnai limfosit dan monosit. Karena stabilitas enzimatik dalam jaringan yang difiksasi dengan formalin dan tertanam parafin, pewarnaan ini sangat berguna untuk mengidentifikasi granulosit dan sel mast pada bagian jaringan dan sangat membantu dalam diagnosis tumor myeloid ekstrameduler (sarkoma granulositik dan kloroma). Enzim esterase seluler menghidrolisis substrat naftol AS-D kloroasetat. Produk reaksi ini kemudian digabungkan dengan garam diazo untuk membentuk produk reaksi berwarna merah-merah muda cerah di lokasi aktivitas enzimatik. Aktivitas enzim dihambat oleh adanya merkuri, larutan asam, panas, dan yodium yang dapat menimbulkan hasil pewarnaan negatif palsu.<sup>6</sup>

#### d. Esterase Nonspesifik ( $\alpha$ -Naphthyl Butyrate atau $\alpha$ -Naphthyl Acetate).

Pewarnaan esterase nonspesifik ( $\alpha$ -naphthyl butyrate atau  $\alpha$ -naphthyl acetate) digunakan untuk mengidentifikasi sel monositik, namun tidak mewarnai granulosit atau eosinofil.<sup>6,17</sup> Limfosit T dewasa diwarnai dengan karakteristik fokus, pola seperti titik.

Pewarna ini juga bereaksi dengan makrofag, histiosit, megakariosit, dan beberapa karsinoma. Pewarnaan  $\alpha$ -naftil butirat dianggap lebih spesifik, meskipun sedikit kurang sensitif, dibandingkan pewarnaan  $\alpha$ -naftil asetat. Pewarnaan diferensial dengan esterase yang berbeda terlihat pada megakarioblas, yang tidak diwarnai dengan  $\alpha$ -naftil butirat, namun pewarnaan dengan substrat  $\alpha$ -naftil asetat.<sup>6</sup>

#### e. Terminal Deoksinukleotidil Transferase

Terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) adalah enzim intranuklear yang mengkatalisis penambahan deoksinukleotida trifosfat ke ujung 3'-hidroksil oligonukleotida atau polideoksinukleotida tanpa memerlukan untai template.<sup>18</sup> Terminal deoxynucleotidyl transferase biasanya ditemukan di inti timosit dan sel limfoid yang belum matang di dalamnya, tetapi tidak ditemukan pada limfosit dewasa, dan merupakan penanda yang berguna dalam mengidentifikasi leukemia limfoblastik akut dan limfoma. Aktivitas TdT ditemukan pada sekitar 90% leukemia limfoblastik akut serta sebagian kecil leukemia myeloid akut.<sup>19</sup> Kadar TdT dapat diukur secara biokimia, dengan pewarnaan sitokimia dengan teknik deteksi imunofluoresen, dengan flow cytometry setelah permeabilisasi sel yang baru dikumpulkan, atau dengan metode imunohistokimia.<sup>20</sup> Pewarnaan imunofluoresen tidak langsung sangat sensitif dan dapat diterapkan pada sampel yang dikeringkan di udara beberapa minggu setelah pengumpulan, meskipun pewarnaan ini jarang digunakan karena meluasnya penggunaan flow cytometry.<sup>6</sup> Metode imunohistokimia untuk mendeteksi TdT berguna di bagian jaringan yang tertanam parafin dan dapat digunakan pada preparat sentuh.<sup>6,20</sup>

#### f. Leukosit Alkali Fosfatase

Aktivitas alkali fosfatase ditemukan di sitoplasma neutrofil, osteoblas, sel endotel vaskular, dan beberapa limfosit. Kadar alkaline fosfatase neutrofil darah tepi diukur dengan skor leukosit alkaline fosfatase (LAP) dan berguna sebagai tes skrining untuk membedakan leukemia myeloid kronis dari reaksi leukemoid dan kelainan mieloproliferatif lainnya. Pasien dengan leukemia myeloid kronis memiliki skor LAP yang rendah (biasanya antara 0 dan 13). Hemoglobinuria nokturnal paroksismal dan beberapa sindrom mielodisplastik juga dapat ditandai dengan skor LAP yang rendah. Reaksi leukemoid sebagai respons terhadap infeksi dan neoplasma mieloproliferatif

lainnya (mielofibrosis primer dan polisitemia vera) sering kali memiliki skor LAP yang meningkat.<sup>21</sup>

g. Asam fosfatase

Asam fosfatase ditemukan di semua sel hematopoietik, namun kadar tertinggi ditemukan di makrofag dan osteoklas. Pola seperti titik yang terlokalisasi terlihat pada banyak limfoblas T, namun pola pewarnaan ini tidak dapat diandalkan. Asam fosfatase tahan tartrat (TRAP) adalah isoenzim asam fosfatase yang ditemukan dalam jumlah tinggi pada sel leukemia hairy dan osteoklas.<sup>6</sup>

h. Periodic acid-Schiff

Pewarnaan periodik acid-Schiff (PAS) mendeteksi glikogen intraseluler dan mukopolisakarida netral, yang ditemukan dalam jumlah bervariasi di sebagian besar sel hematopoietik. Pewarnaan PAS terlihat pada leukemia limfoblastik akut dan leukemia myeloid akut, meskipun terdapat variabilitas yang besar antar kasus. Eritroleukemia menunjukkan kepositifan sitoplasma difus yang intens dengan PAS, yang mungkin membantu dalam diagnosis.<sup>22</sup> Selain itu, pewarnaan PAS sangat berguna dalam menunjukkan akumulasi glukoserebrosidase abnormal pada penyakit Gaucher.<sup>23</sup>

i. Cadangan Zat Besi

Pewarnaan Prussian Blue harus dilakukan pada apusan sumsum tulang untuk evaluasi penyimpanan besi dan sideroblas. Pewarnaan zat besi harus dilakukan pada semua aspirasi sumsum tulang awal, tidak diperlukan pada aspirasi sumsum tulang lanjutan, misalnya, untuk leukemia. Jika ada dry tap, preparat biopsi inti dan imprint dapat diwarnai untuk besi. Spesimen dari biopsi inti kurang dapat diandalkan dibandingkan aspirasi untuk menilai simpanan besi, karena dekalsifikasi menghilangkan simpanan besi.<sup>11</sup>

j. Toluidine Biru

Toluidine blue secara spesifik menandai basofil dan sel mast dengan bereaksi dengan asam mukopolisakarida dalam granula sel untuk membentuk kompleks metakromatik. Sel mast atau basofil ganas mungkin memiliki kadar mukopolisakarida asam yang rendah dan mungkin tidak bereaksi dengan pewarnaan ini. Penanda

imunohistokimia spesifik, seperti pewarnaan triptase sel mast, mungkin lebih spesifik dalam identifikasi sel mast dibandingkan pewarnaan toluidine biru.<sup>24</sup>

#### k. Pewarnaan Imunositokimia

Pewarnaan imunositokimia didasarkan pada penggunaan antibodi yang mengenali epitop antigenik spesifik pada sel. Ada tingkat kekhususan yang tinggi. Secara umum, apusan ini dapat diaplikasikan pada apusan darah, aspirasi sumsum tulang, suspensi sel, atau bagian jaringan. Tidak semua sediaan antibodi sama efektifnya pada semua jenis spesimen, dan prosedur pewarnaan mungkin berbeda-beda tergantung jenis spesimen. Berbagai macam antibodi spesifik terhadap antigen seluler hematopoietik tersedia secara komersial. Beberapa antibodi baru telah menggantikan pewarna sitokimia klasik dan mungkin berguna pada spesimen yang lebih tua atau yang sudah diperbaiki.<sup>6</sup>

Pewarnaan imunositokimia dari suspensi sel darah segar atau sumsum tulang atau suspensi sel dari jaringan dan analisis dengan flow cytometry adalah modalitas pengujian tambahan yang umum digunakan ketika dicurigai adanya keganasan hematologi.<sup>25,26</sup> Flow cytometer mendeteksi data penyebaran cahaya dan keberadaan antibodi spesifik berlabel fluorokrom yang telah terikat pada permukaan sel. Penggunaan fluorokrom yang berbeda memungkinkan lebih dari satu antibodi dipelajari secara bersamaan pada sel yang sama melalui panjang gelombang eksitasi yang berbeda. Studi tentang penanda permukaan sel ini memungkinkan analisis limfoma dan leukemia yang cepat dan akurat, penghitungan subset sel T, dan identifikasi sel tumor. Selain itu, kemajuan terkini telah memungkinkan deteksi antigen intracytoplasmic atau nuklir, seperti myeloperoxidase dan TdT, dengan analisis flow cytometry. Dalam banyak kasus, khususnya pada leukemia akut, analisis flow cytometry pada leukemia akut memberikan informasi prognostik penting yang tidak tersedia melalui pewarnaan sitokimia dan berguna dalam mendeteksi penyakit sisa minimal.<sup>6,25</sup>

#### ***Dry taps***

*Dry taps* pada aspirasi sumsum tulang berarti tidak ada sel sumsum tulang yang diperoleh, sehingga perlu dilakukan pengambilan biopsi *trephine* jika bahan diagnostik diperlukan. *Dry tap* umumnya disebabkan oleh reaksi fibrotik pada sumsum tulang atau peningkatan selularitas yang tinggi ('padat') sehingga menghambat aspirasi.<sup>27</sup>

**Tabel 4. Penyebab dan Diagnosis Dry Taps.<sup>27</sup>**

Penyebab dry tap	Diagnosis	Tipe antibodi
<b>a. Fibrosis</b>	Karsinoma sekunder	Sitokeratin, antigen membran epitel
	Neuroblastoma	Neuroblastoma-associated antigen (NB84)
	Rhabdomyosarcoma	Desmin atau mioglobin
	Limfoma Hodgkin	CD15 atau CD30
<b>b. Hiperseluler</b>	Limfoma	Tergantung jenisnya
	Leukemia	Tergantung jenisnya
	Reaktif	CD61 → megakariosit Mieloperoksidase → granulosit Glikoforin A atau C → eritroid VS38 (antigen p63) → sel-sel plasma

**Tabel 5. Artefak Sumsum Tulang.<sup>7</sup>**

Spesimen	Artefak	Penyebab
Aspirasi sumsum tulang	Pengecatan suboptimal	Larutan cat yang sudah lama atau terkontaminasi, waktu pengecatan yang tidak adekuat
	Partikel tidak adekuat	Teknik aspirasi yang buruk, dry tap
	Penghancuran dan distorsi sel	Pelatihan yang tidak adekuat, prosedur yang tidak benar
	Apusan tebal	Spesimen beku, pelatihan yang tidak adekuat, prosedur yang tidak benar
	Distribusi sel yang tidak merata	Spesimen beku, Pelatihan yang tidak adekuat, prosedur yang tidak benar
Spesimen beku		Teknik yang buruk, aspirasi multipel memicu aktivasi koagulasi lokal, sistem koagulasi hiperaktif

## Kesimpulan

Pemeriksaan sumsum tulang adalah prosedur yang mudah, cepat, hemat biaya, dan dapat digunakan untuk penentuan diagnosis dan mengevaluasi kondisi hematologis dan non hematologis. Pada beberapa kasus tertentu, di mana pemeriksaan rutin tidak dapat untuk penetapan diagnosis akhir, pemeriksaan ini dapat membantu dalam diagnosis penyakit. Spesimen sumsum tulang mengandung banyak informasi diagnostik dan prognostik, sehingga memerlukan perencanaan sebelumnya agar dapat dipergunakan dengan optimal; antara lain: pengetahuan detail mengenai riwayat pasien, indikasi prosedur, cara pembuatan dan pewarnaan, serta kebutuhan spesimen untuk setiap pemeriksaan. Semua data yang diperoleh dari pemeriksaan tambahan harus dikorelasikan dengan informasi klinis, riwayat pasien, temuan morfologis, dan pemahaman aspek teknik prosedur.

#### Daftar Pustaka

1. Riley RS, Hogan TF, Pavot DR, Forysthe R, Massey D, Smith E, *et al.* A pathologist's perspective on bone marrow aspiration and biopsy; Performing a bone marrow examination. *J Clin Lab Anal.* 2004;18(2):70–9.
3. Fareed N, Mehmood T, Quraishy M.S, Fatima G, Pattern of hematological disorders on bone marrow examination: a tertiary care hospital experience, *Hematol Transfus Int J.* 2021;9(6):117–120. <http://medcraveonline.com>.
4. Chowdhury M.R.K, Rashid M.H, Begum A, Diagnostic Role of Bone Marrow Examination in Detecting Haematological and Nonhaematological Disorders, *Medicine Today*, 2019 Volume 31 Number 01.
5. Reddy V.V.B. and Morlote D, Chapter 2: Examination of blood and marrow cells, *Williams Hematology Tenth Edition*, Kaushansky K, Prchal JT., Burns LJ., Lichtman, MA, Levi M, Linch DC., 2021 by McGraw Hill.
6. Ciesla B, *Hematology in Practice*, 2007, Philadelphia: F.A. Davis Company pp. 16 and 22. [www.fadavis.com](http://www.fadavis.com)
7. Smock, K.J. Chapter 1: Examination of the Blood and Bone Marrow, in: Greer JP, Rodgers GM, Glader B, Arber BA, Means RT, List AF, *et al*, editors., 2019, *Wintrobe's Clinical Hematology*, 14th Ed., Vol 1; 1-20, Philadelphia, Lippincott.
8. Riley RS, Willaims D., Rose M, Zhao S, Chesney A., Clark BD., Ben-Ezra JM., Bone marrow aspirate and biopsy: A pathologist's perspective. II. Interpretation of bone marrow aspirate and biopsy, *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 2009, 23: 259-307.
9. Fend F, Kremer M. Diagnosis and classification of malignant lymphoma and related entities in the bone marrow trephine biopsy. *Pathobiology.* 2007;74(2):133–143.
10. Munker R, Chapter 1 Basic Biology of Hemopoiesis, *Modern Hematology, Biology and Clinical Management*, Second Edition, Edited by Munker R, Hiller E, Glass J, paquette R, 2007 Humana Press Inc., Totowa, New Jersey, p. 2, 15, 16.
11. Shastry SM, Kolte SS. Spectrum of hematological disorders observed in one hundred and ten consecutive bone marrow aspiration and biopsies. *Med J D Y Patil Univ.* 2012;5(2):118–121.
12. Lee S-H, Erber WN, Porwit A, *et al.* ICSH guidelines for the standardization of bone marrow specimens and reports. *Int J Lab Hematol.* 2008; 30:349-64.
13. Lancet Laboratories, 2019, The bone marrow aspirate and trephine biopsy (BMAT) procedure, [www.lancet.co.za](http://www.lancet.co.za).
14. Bain BJ, Bone marrow Aspiration, *J Clin Pathol*, 2001;54; 657-663



15. Bain BJ and Lewis SM, chapter 4: Preparation Of Blood Films On Slides, in Bain BJ , Bates I, Iaffan M, Lewis SM, Dacie and Lewis Practical Haematology, 11th ed., Elsevier - Churchill Livingstone, 2012
16. Bates I and Berthem J, chapter 7: Bone marrow Biopsy, in : in Bain BJ , Bates I, Iaffan M, Lewis SM, Dacie and Lewis Practical Haematology, 11th ed., Elsevier -Churchill Livingstone, 2012.
17. Saravanan L, Juneja S. Immunohistochemistry is a more sensitive marker for the detection of myeloperoxidase in acute myeloid leukemia compared with flow cytometry and cytochemistry. *Int J Lab Hematol.* 2010;32(1, Pt 1):e132-e136.
18. Strober W. Wright-Giemsa and nonspecific esterase staining of cells. *Curr Protoc Cytom.* 2001; Appendix 3: Appendix 3D.
19. Thai TH, Kearney JF. Isoforms of terminal deoxynucleotidyltransferase: developmental aspects and function. *Adv Immunol.* 2005; 86:113-136.
20. McGregor S, McNeer J, Gurbuxani S. Beyond the 2008 World Health Organization classification: the role of the hematopathology laboratory in the diagnosis and management of acute lymphoblastic leukemia. *Semin Diagn Pathol.* 2012;29(1):2-11.mebooksfree.com
21. Al Gwaiz LA, Bassioni W. Immunophenotyping of acute lymphoblastic leukemia using immunohistochemistry in bone marrow biopsy specimens. *Histol Histopathol.* 2008;23(10):1223-1228.
22. Li CY. The role of morphology, cytochemistry and immunohistochemistry in the diagnosis of chronic myeloproliferative diseases. *Int J Hematol.* 2002;76(suppl 2):6-8.
23. WHO. World Health Organization Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. 4th ed. Lyon, France: IARC Press; 2008.
24. Chen M, Wang J. Gaucher disease: review of the literature. *Arch Pathol Lab Med.* 2008;132(5):851- 853.
25. Johnson MR, Verstovsek S, Jorgensen JL, et al. Utility of the World Health Organization classification criteria for the diagnosis of systemic mastocytosis in bone marrow. *Mod Pathol.* 2009;22(1):50-57.
26. Davis BH, Holden JT, Bene MC, et al. 2006 Bethesda International Consensus recommendations on the flow cytometric immunophenotypic analysis of hematolymphoid neoplasia: medical indications. *Cytometry B Clin Cytom.* 2007;72(suppl 1):S5-S13.
27. Weir EG, Borowitz MJ. Flow cytometry in the diagnosis of acute leukemia. *Semin Hematol.* 2001;38(2):124-138.
28. Gatter K and Brown D, chapter 2 The normal bone marrow, in: Brown D, Gatter K, Natkunam Y., Warnke R., *Bone Marrow Diagnosis, An Illustrated Guide*, Third edition, 2015 by John Wiley & Sons Ltd. West Sussex, PO19 8SQ, UK, P 4-16.

## 5.2. Evaluasi Sediaan Apusan Darah Tepi dan Sumsum Tulang Fokus pada Morfologi dan Identifikasi Sebagai Penunjang Diagnosis

Dr. dr. Nyoman Suci Widyastiti, M.Kes, Sp.PK, Subsp.H.K.(K), Subsp.I.K.(K)  
Bagian patologi Klinik Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro / RSUP Dr. Kariadi  
Semarang

Sitomorfologi merupakan titik awal yang sangat diperlukan dalam diagnosis penyakit hematologi. Di masa lalu, sekarang dan masa mendatang, sitomorfologi telah, sedang dan akan tetap menjadi yang terdepan dalam diagnostik hematologi. Sitomorfologi memberikan *assessment* spesimen yang cepat dan dengan demikian memungkinkan diagnostik bertahap yang hemat waktu dan biaya. Meskipun genetika berperan penting dan sebagian menentukan klasifikasi leukemia menurut WHO, keberadaan  $\geq 20\%$  sel blas dalam darah tepi atau sumsum tulang merupakan persyaratan untuk diagnosis leukemia akut, sehingga sitomorfologi menjadi sangat penting untuk klasifikasi leukemia.<sup>1</sup> Pada tulisan ini akan dijelaskan sitomorfologi pada kelainan yang paling banyak ditemukan, antara lain leukemia akut (Leukemia Limfoblastik akut dan Leukemia Mieloid Akut), leukemia kronis (Leukemia myeloid Kronis dan Leukemia Limfositik Kronis), anemia aplastik, *Myelodysplastic Syndrome* (MDS), *Essential thrombocythemia* (ET) dan *Polycythemia Vera* (PV).

### 1. LEUKEMIA AKUT

Leukemia akut ditandai dengan proliferasi sel darah *lineage* limfoid dan mieloid imatur yang tidak terkontrol. Klasifikasi morfologi leukemia berdasar pada pada identifikasi *lineage* leukemia dan tahap diferensiasinya. Saat ini, meskipun terdapat klasifikasi baru berdasarkan penelitian yang canggih, klasifikasi *French-American-British* (FAB) banyak digunakan oleh para ahli karena kesederhanaan teknisnya, keandalan diagnostik yang baik, dan efektivitas biaya.<sup>1,2</sup>

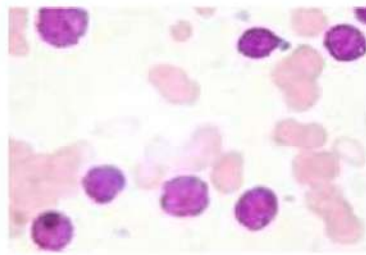
#### 1.1 Klasifikasi FAB untuk *Acute Lymphoblastic Leukaemia* (ALL).

Subtipe, morfologi, imunofenotipe dan prevalensi leukemia limfoblastik akut (ALL) dijelaskan pada gambar 1.<sup>2</sup> Karena kesulitan dalam membedakan sel subtipe L1 dan L2, maka FAB menerbitkan versi amandemen sistem klasifikasi mereka pada tahun 1981 dengan sistem penilaian untuk mengidentifikasi ALL L1 dan L2 berdasarkan 4

karakteristik sitologi: rasio inti : sitoplasma, keberadaan anak inti, karakteristik membran inti, dan ukuran sel (tabel 1)<sup>2</sup>.

<b>Tabel 1. Klasifikasi FAB untuk <i>Acute Lymphoblastic Leukaemia (ALL)</i>.<sup>2</sup></b>	
Kriteria	Klasifikasi
Rasio inti : sitoplasma tinggi > 75% sel	+
Rasio inti : sitoplasma rendah > 25% sel	-
Anak inti : 0 - 1 (kecil) > 75% sel	+
Anak inti : 1 atau lebih (prominen) > 25% sel	-
Membran inti ireguler > 25% sel	-
Megaloblasts > 50% sel	-
Jumlahkan total tanda yang diperoleh. Klasifikasi total : skor -4 hingga +2 L1 leukemia limfoblastik akut : skor 0 hingga +2 L2 leukemia limfoblastik akut : skor -1 hingga -4	

## Klasifikasi FAB Leukemia Limfoblastik Akut



### L1 Lymphoblastic leukaemia with homogeneous structure

#### Frekuensi :

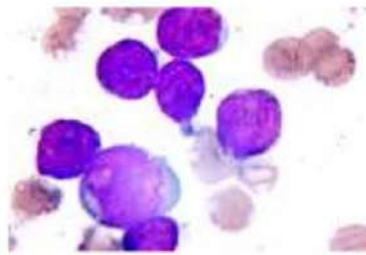
Antara 25% - 30% kasus orang dewasa dan 85% kasus pada anak-anak

#### Morfologi :

Sel blas homogen, nukleus regular, kromatin homogen, anak inti kecil atau tidak ada, sitoplasma sempit dan basofilia ringan hingga sedang.

#### Imunofenotipe

B:	T:
*CD19	*CD3
*CD22	*CD7
*CD79a	*CD5
*CD10	*CD2
*CD20	*CD4
*Cytoplasmic or superficial immunoglobulin	



### L2 Lymphoblastic leukaemia with varied structure

#### Frekuensi :

70% kasus pada orang dewasa, dan 14% pada anak-anak

#### Morfologi :

Nukleus iregular, struktur kromatin heterogen, anak inti besar

#### Imunofenotipe

B:	T:
*CD19	*CD3
*CD22	*CD7
*CD79a	*CD5
*CD10	*CD2
*CD20	*CD4
*Cytoplasmic or superficial immunoglobulin	



### L3 Burkitt's leukaemia

#### Frekuensi :

Subtipe jarang, sekitar 1-2 % kasus

#### Morfologi :

Sel blas besar, nucleoli prominens, struktur kromatin homogen bertitik, sitoplasma lebar, vakuolisasi sitoplasmik (bubble type) menutupi nukleus.

#### Imunofenotipe

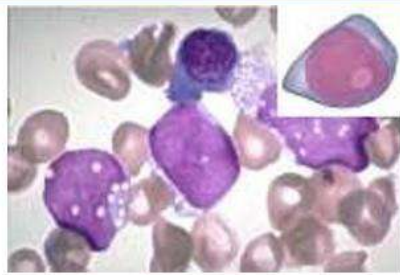
B:	T:
*CD19	*CD3
*CD22	*CD7
*CD79a	*CD5
*CD10	*CD2
*CD20	*CD4
*Cytoplasmic or superficial immunoglobulin	

**Gambar 1. Subtipe, Morfologi, Imunofenotipe dan Prevalensi Leukemia Limfoblastik Akut (ALL)<sup>2</sup>**

## 1.2. Klasifikasi FAB untuk *Acute Myeloblastic Leukaemia* (AML).<sup>2</sup>

Gambar 2 dan 3 menunjukkan morfologi dan imunofenotipe leukemia mieloblastik akut (AML), bersama dengan gambaran mikroskopis dan resume singkat<sup>2</sup>.

## Klasifikasi FAB *Acute Myeloblastic Leukaemia (AML)*



**M0** *Acute myeloblastic leukaemia with minimal differentiation*

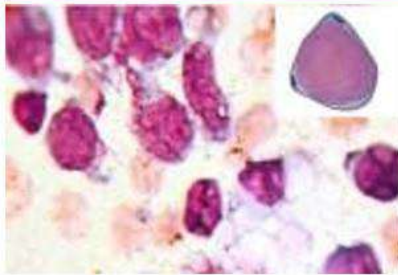
Morfologi:

Dapat menyerupai sel blas LLA-L2. Sel blas ukuran sedang, inti membulat, kromatin halus, sitoplasma basofilik non granular, nucleoli prominan.

Imunofenotipe

- CD13 +
- CD33 +
- CD11b +
- CD11c +
- CD14 +
- CD15 +

*Photo courtesy of, Acute myeloid leukemia pathophysiology, 2012*



**M1** *Acute myeloblastic leukaemia without maturation*

Morfologi :

Sel blas berukuran medium dengan rasio inti - sitoplasma tinggi, inti bulat dengan kromatin imatur, terdispersi dengan 1 atau lebih anak inti yang prominan. Dapat ditemukan granula azurofilik halus pada sel blas atau Auer rod di sitoplasma pada 5 % - 10 % kasus.

Imunofenotipe

- MPO +
- CD13 +
- CD33 +
- CD117+
- CD34 +/-



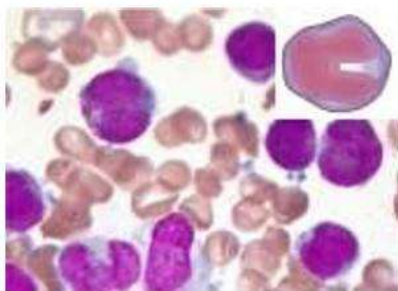
**M2** *Acute myeloblastic leukaemia with maturation*

Morfologi :

Sel blas berukuran kecil hingga sedang dengan rasio inti sitoplasma tinggi dan inti membulat yang terkadang berada di sudut/pojok sitoplasma. Inti dengan kromatin imatur, terdispersi dengan 1 atau lebih anak inti. Sitoplasma basofilik dan dapat ditemukan jejak granula azurofilik atau Auer rod.

Imunofenotipe :

- MPO +
- CD34 +/-
- CD13 +
- CD15 +
- HLA-DR +/-
- Sudan black +
- CD117 +/-



**M3** *Promyelocytic leukaemia*

Morfologi:

Granulasi azurofilik yang intens dan melimpah. Inti biasanya tampak monositik ('reniform' / seperti ginjal) dan ireguler dan atau bilobus dengan celah yang dalam. Hampir tidak ditemukan sitoplasma basofilik karena proliferasi dari granulasi azurofilik. Beberapa promielosit atipikal juga mengandung benda inklusi sitoplasma kristalin yang memanjang atau berbentuk serpihan yang spesifik untuk jenis leukemia ini. Biasanya berbentuk *clump* / gumpalan, namun berbeda dengan Auer rod karena pada mikroskop elektronik terlihat substruktur berbentuk tubuler.

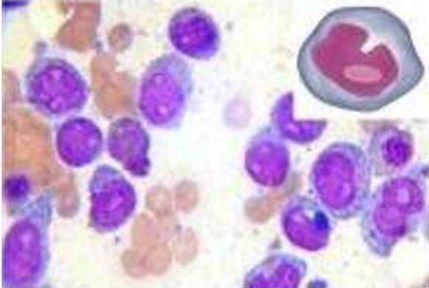
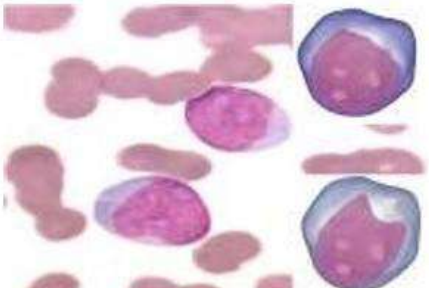
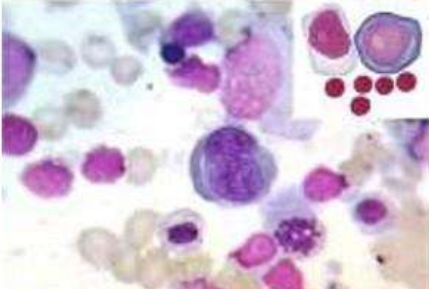
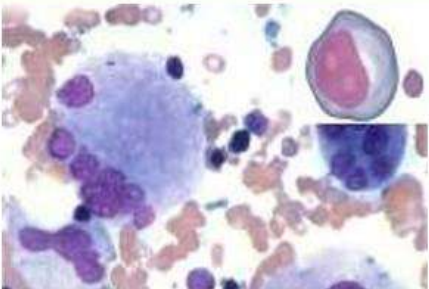
Imunofenotipe

- CD13 +
- CD33 +
- HLA-DR -
- CD34 -

**Gambar 2. Morfologi dan Imunofenotipe Leukemia Mieloblastik Akut (AML)<sup>2</sup>**



### Klasifikasi FAB dari Acute Myeloblastic Leukaemia (AML)

	M4	Acute myelomonocytic leukaemia	Morfologi :	Imunofenotipe :
			Sel blas besar, rasio inti - sitoplasma moderate (sedang) dan basofilia bervariasi. Inti bulat, berbentuk ginjal atau ireguler. Anak inti biasanya prominan.	<ul style="list-style-type: none"> <li>•CD13 +</li> <li>•CD15 +</li> <li>•CD33 +</li> <li>•CD11b +</li> <li>•CD11c +</li> <li>•CD14 +</li> <li>•CD64 +</li> <li>•CD4 +</li> </ul>
	M5	Acute monocytic leukaemia	Morfologi :	Imunofenotipe :
			<i>M5a acute monoblastic leukaemia:</i>	
			Sel blas besar dengan inti bulat dan kromatin imatur yang tersebar (1-3 nukleolus) dan sitoplasma cukup besar dan sangat basofilik. Sitoplasma mungkin menunjukkan beberapa Auer rod dan/atau pemanjangan dan granulasi.	<ul style="list-style-type: none"> <li>•CD14 +</li> <li>•CD68 +</li> <li>•CD4 +</li> <li>•CD11c +</li> <li>•HLA-DR +</li> <li>•CD64 +</li> </ul>
			<i>M5b acute monocytic leukaemia</i> Promonosit memiliki inti bulat atau berbentuk ginjal dengan sitoplasma kurang basofilik yang lebih bergranulasi dibandingkan monoblas dan mengandung beberapa vakuola. Temuan eritrofagositosis bersama dengan sel blas monositik menunjukkan adanya translokasi t(8;16).	
	M6	Acute erythroid leukaemia	Morfologi :	Imunofenotipe :
			<i>M6a erythroid leukaemia with proliferation of mixed blasts:</i>	
			Lebih dari 50% prekursor eritroid dan sekitar 30% mieloblas. Morfologi eritrosit dalam darah tepi sangat berubah, dengan schistosit, sel "terjepit" atau berbentuk jamur, sel echinosit berspikula dan akantosit.	<ul style="list-style-type: none"> <li>•CD13 +</li> <li>•CD33 +</li> <li>•CD15 +</li> <li>•Glycophorin A +</li> <li>•Glycophorin C +</li> </ul>
			<i>M6b pure erythroid leukaemia:</i>	
			Eritroid membentuk 80% sel sumsum tulang, dengan kurang dari 3% sel mieloid. Eritrosit dalam darah tepi terdiri dari makrosit, basofilik stippling, Howell-Jolly bodies atau cincin Cabot.	
	M7	Acute megakaryocytic leukaemia	Morfologi:	Imunofenotipe :
			Sel blas polimorfik yang sangat imatur. Inti eksentrik dengan kromatin retikulasi yang tersebar dan 1-3 anak inti yang prominan. Sitoplasma non-granular, basofilik, dan sangat mirip dengan trombosit, dengan pseudopoda atau granulasi. Mikromegakariosit dan fragmen megakarioblas terlihat pada darah tepi ( <i>giant platelet</i> , beberapa sangat terdegranulasi).	<ul style="list-style-type: none"> <li>•CD41 +</li> <li>•CD61 +</li> <li>•CD42 +</li> <li>•CD13 +</li> <li>•CD33 +</li> <li>•CD34 +</li> </ul>

**Gambar 3. Morfologi dan Imunofenotipe Leukemia Mieloblastik Akut (AML)<sup>2</sup>**

### **1.2.1. M0 *Acute myeloblastic leukaemia***

Leukemia mieloblastik dengan diferensiasi minimal, atau M0-AML, sangat sulit didiagnosis secara morfologi karena sel blas tersebut menunjukkan gambaran limfoblastik dan mieloblastik. Jumlahnya hanya 5% dari AML dewasa.

### **1.2.2. M1 *Acute myeloblastic leukaemia***

Pada leukemia mieloblastik akut tanpa maturasi (M1), sel biasanya monomorfik, dengan sel blas mieloid di darah tepi dan tidak ditemukan sel selain mieloblas.

### **1.2.3. M2 *Acute myeloblastic leukaemia***

Leukemia mieloblastik akut dengan maturasi (M2) merupakan sekitar 30% dari seluruh kasus AML. Lebih dari 10% sel berada pada tahap pasca-mieloblas (promielosit, mielosit, dan neutrofil). Sepertiga dari seluruh kasus AML-M2 berhubungan dengan translokasi t(8;21).

### **1.2.4. M3 *Acute myeloblastic leukaemia (Acute Promyelocytic Leukaemia, APML/APL)***

Leukemia promielositik akut (M3) biasanya disertai dengan rendahnya kadar leukosit pada darah tepi, sehingga membuat diagnosis menjadi sulit. Mayoritas sel mempunyai morfologi yang sangat khas yang disebut promielosit atipikal (sel hipergranular). Gejalanya bisa berupa perdarahan hebat akibat *disseminated intravascular coagulation* (DIC). Karakteristik *cytogenic* AML-M3 adalah t(15;17), yang mengarah pada fusi gen PML (promyelocytic leukemia) dan retinoic acid receptor-alpha (RAR $\alpha$ ), sehingga menghasilkan transkrip PML-RAR $\alpha$ .

#### ***Microgranular variant of AML-M3***

Merupakan 15%-20% dari seluruh kasus M3. Prognosisnya lebih buruk dibandingkan M3 normal/klasik, dan biasanya ditemukan leukositosis. Secara morfologi, ditandai dengan sel-sel leukemia bergranulasi jarang. Sitoplasma lebih basofilik dibandingkan M3 normal/klasik, karena konsentrasi granula azurofilik yang lebih rendah.

### **1.2.5. M4 *Acute myeloblastic leukaemia (Acute Myelomonocytic Leukaemia)***

Leukemia mielomonositik akut (M4) merupakan 20% dari semua kasus AML.

Secara klinis, 10% pasien menunjukkan hiperplasia ginggiva. Leukemia jenis ini mempunyai komponen granulosit dan komponen monosit dengan proporsi yang bervariasi dan derajat maturasi yang berbeda. Secara sitokimia, M4 positif pada pengecatan *kloroasetat esterase*, dan monosit positif pada pengecatan *naphthol-AS-d-acetate esterase* atau  *$\alpha$ -naphthyl butyrate esterase*.

**Varian M4Eo:** bilamana setidaknya terdapat 5% eosinofil abnormal, dengan inti monositoid dan granula atipikal

#### **1.2.6. M5 Acute myeloblastic leukaemia (Acute Monoblastic/Monocytic Leukaemia)**

Merupakan sekitar 15% dari seluruh kasus AML. Sel-sel leukemia berasal dari *lineage* monositik (monoblas dan promonosit). AML M5 terdiri dari: M5a atau leukemia monoblastik akut, yang didominasi oleh monoblas, dan merupakan 5% - 8% dari seluruh AML; dan M5b atau leukemia monositik akut, di mana ditemukan sebagian besar promonosit dan monosit, selain monoblas. Merupakan 3% - 6% kasus AML.

Bentuk monoblastik biasanya terkait dengan translokasi genetik t(9;11), t(6;11) dan t(8;16) dan 11q23 *rearrangements* (AML with recurrent genetic abnormalities menurut klasifikasi WHO).

#### **1.2.7. M6 Acute myeloblastic leukaemia (Acute Erythroid Leukaemia)**

Subtipe eritroid M6 didefinisikan oleh FAB sebagai proliferasi elemen eritroid displastik dengan proliferasi sel blas yang berasal dari mieloid. Klasifikasi WHO mengkarakterisasi 2 subtipe: eritroleukemia (M6a), digambarkan sebagai proliferasi campuran sel blas mieloid dan eritroid, dan dapat disebabkan oleh sindrom mielodisplastik sebelumnya. M6a merupakan 5-6% dari semua kasus AML. Subtipe lainnya adalah varian *pure erythroid* (M6b) bilamana ditemukan diseritropoiesis prominen.

#### **1.2.6. M7 Acute myeloblastic leukaemia (Acute megakarioblastic Leukaemia)**

Leukemia mieloblastik akut (AML-M7) merupakan 3-5% dari semua kasus AML. Morfologi sel blas sering berkorelasi dengan kelainan sitogenetik pada AML. Kasus AML dengan t(8;21) sering kali terdapat sel blas yang besar dengan banyak granula azurofilik, yang terkadang berukuran sangat besar (tipe pseudo-Chediak-Higashi), dan *paranuclear clearing* atau *hofs*. Auer rod yang panjang dan tipis sering terlihat dan



eosinofil meningkat. AML dengan t(15;17) (juga dikenal sebagai leukemia promielositik akut, APL) ditandai dengan promielosit abnormal dengan inti bilobus atau berlekuk dan sitoplasma sedang, umumnya dengan granula sitoplasma yang melimpah dan Auer rod dapat berbentuk bundel (“sel faggot”). AML dengan inv(16) terdapat sel blas dengan ciri mielomonositik dan peningkatan jumlah eosinofil pada semua tahap maturasi.<sup>1,3</sup>

## 2. LEUKEMIA KRONIS<sup>3</sup>

### 2.1. Leukemia mieloid kronis (*Chronic myeloid leukaemia*, CML), BCR-ABL1+

Leukemia mieloid kronis, BCR-ABL1+ (*Chronic myeloid leukaemia*, CML), adalah neoplasma mieloproliferatif yang berasal dari sel induk sumsum tulang pluripoten abnormal yang mengandung gen fusi BCR-ABL1 pada kromosom Philadelphia (Ph). CML dibagi menjadi tiga fase penyakit berdasarkan jumlah sel blas di sumsum tulang dan darah tepi serta gambaran klinis dan patologis lainnya: 1. Fase kronis (*Chronic Phase*, CP), 2. Fase akselerasi (*Accelerated Phase*, AP), dan 3. Fase blastik (*Blastic Phase*, BP). Fase blastik CML memenuhi ciri-ciri leukemia myeloid akut, limfoid, atau *mixed lineage* leukemia. Sebagian besar pasien datang pada kondisi CP, namun kadang-kadang pasien mungkin didiagnosis pertama kali pada fase penyakit akselerasi atau bahkan blastik.<sup>4</sup>

Pada fase kronis CML (CML-CP), biasanya ditandai leukositosis dengan pematangan neutrofilik *left-shifted*, eosinofilia, dan basofilia pada darah tepi. Sumsum tulang menunjukkan hiperselularitas yang nyata, biasanya mendekati 100%, dengan proliferasi granulositik yang ekstrim pada semua tahap maturasi. Biasanya terdapat peningkatan rasio mieloid : eritroid yang nyata. Megakariosit meningkat (> 6 / LPB) pada sekitar 50% kasus CML, dan sering membentuk cluster. Megakariosit biasanya lebih kecil dari megakariosit normal dan mempunyai inti hipolobasi (‘dwarf megakaryocytes’). Sering terlihat histiosit pseudo-Gaucher atau *seablue histiocytes*.<sup>4</sup>

Pada hampir semua kasus ditemukan peningkatan eosinofil dan basofil pada sumsum tulang. Pada sebagian besar kasus pada saat diagnosis terdapat sel blas <5% dari sel berinti di sumsum tulang. Dapat ditemukan fibrosis retikulin dengan derajat bervariasi. Displasia yang signifikan bukan merupakan ciri CML-CP, namun dapat menjadi ciri perkembangan penyakit ke fase akselerasi atau fase blastik.

Beberapa sistem klasifikasi berbeda telah dikembangkan untuk menentukan fase CML berdasarkan kriteria morfologi dan klinis, antara lain *International Bone Marrow*

Transplant Registry (IBMTR), The University of Texas MD Anderson Cancer Center (MDACC), dan klasifikasi World Health Organization (WHO) (Tabel 2).<sup>5</sup>

**Tabel 2. Klasifikasi Fase CML<sup>5</sup>**

	Modified MDACC Criteria*	WHO Criteria	IBMTR
Accelerated Phase	Blood or marrow blasts 15-29%	Blood or marrow blasts 10-19%	Hb < 8 g/dL
	Blood or marrow blasts and promyelocytes $\geq$ 30%	Blood basophils > 20%	WBC > $100 \times 10^9/L$
	Blood basophils > 20%	Plts < $100 \times 10^9/L$ or $> 1,000 \times 10^9/L$	Plts < $100 \times 10^9/L$ or $> 1,000 \times 10^9/L$
	Plts < $100 \times 10^9/L$	Increasing spleen size and WBC	Splenomegaly unresponsive to busulfan and hydroxyurea
	CCA/Ph <sup>+</sup>	CCA/Ph <sup>+</sup>	Extramedullary disease
			CCA/Ph <sup>+</sup>
			Blood or marrow blasts > 10%
			Blood or marrow blasts plus promyelocytes > 20%
			Blood basophils and eosinophils > 20%
Blastic Phase	Blood or marrow blasts $\geq$ 30%	Blood or marrow blasts > 20%	Blood or marrow blasts $\geq$ 30%
	Extramedullary blasts (apart from spleen)	Extramedullary blast proliferation	Extramedullary blasts (apart from spleen)
		Large foci or clusters of blasts on bone marrow biopsy	

Abbreviations: MDACC, The University of Texas MD Anderson Cancer Center; WHO, World Health Organization; IBMTR, International Bone Marrow Transplant Registry; CCA/Ph<sup>+</sup>, clonal cytogenetic abnormalities in Ph<sup>+</sup> cells; Plts, platelets; WBC, white blood cells; Hb, hemoglobin.  
\*Commonly used in clinical trials.

### Diagnosis Banding<sup>3</sup>

#### A. *Chronic Neutrophilic Leukemia (CNL)*

Berbeda dengan CML, leukemia neutrofilik kronis (CNL) menunjukkan neutrofilia tanpa peningkatan prekursor neutrofilik atau basofilia dan BCR-ABL1 negatif.

#### B. *Atypical Chronic myeloid leukaemia*

CML atipikal, BCR-ABL1 negatif terdapat neutrofilia dengan prekursor granulositik imatur yang bersirkulasi, namun menunjukkan displasia neutrofil yang signifikan dan tidak terdapat basofilia. CML fase akselerasi dapat ditemukan disgranulopoiesis, yang berpotensi menyerupai CML atipikal. Pada kasus tersebut diperlukan pemeriksaan genetik BCR-ABL1 untuk memastikan diagnosis karena CML atipikal BCR-ABL1 negatif

#### C. *Hypereosinophilic syndrome (HES), chronic eosinophilic leukemia, atau eosinophilic neoplasms.*

Kasus CML dengan eosinofilia yang dominan dapat menyerupai sindrom hipereosinofilik, leukemia eosinofilik kronis. Pemeriksaan BCR-ABL1 membantu memastikan CML dan menyingkirkan neoplasma eosinofilik primer pada kasus tersebut.

## 2.2. Leukemia limfositik kronis (*Chronic lymphocytic leukemia* , CLL)

Leukemia limfositik kronis (*Chronic lymphocytic leukemia* , CLL) adalah leukemia sel B yang paling umum terjadi pada orang dewasa. Terdapat limfositosis absolut, dan berdasarkan flow cytometry, level absolut sel CLL klonal di darah tepi  $\geq 5 \times 10^9$  /L.

Usia rerata saat didiagnosis CLL adalah 60-70 tahun, dengan dominasi laki-laki. Pasien seringkali tidak menunjukkan gejala dan didiagnosis ketika limfositosis ditemukan pada tes darah rutin. Kisaran jumlah limfosit pada saat diagnosis bervariasi, dan jumlahnya mungkin melebihi  $100 \times 10^9$ /L pada beberapa pasien. Pasien yang bergejala biasanya datang dengan kelelahan, gejala yang berhubungan dengan splenomegali, dan/atau limfadenopati perifer.

Trombositopenia autoimun, anemia hemolitik, atau keduanya (sindrom Evans) mungkin muncul saat diagnosis atau mungkin berkembang di kemudian hari selama perjalanan penyakit. CLL adalah penyakit yang *indolent*, dan pasien sering kali meninggal karena penyebab yang tidak terkait.

Pada sediaan apus darah tepi, sel CLL menyerupai limfosit kecil dengan kromatin “chunky”, anak inti tidak ada atau kecil, serta sitoplasma sempit dan pucat. Beberapa sel mungkin terdapat sitoplasma basofilik yang sedikit lebih pucat, inti ireguler, dan/atau anak inti kecil. Pola kondensasi kromatin yang teratur pada sel CLL agak berbeda dengan kromatin yang terkondensasi secara tidak beraturan pada limfosit normal, namun hal ini mungkin sulit terlihat pada banyak sediaan apus darah tepi.

*Smudge cells* (inti sel yang ruptur tanpa sitoplasma) sering terlihat pada sediaan apus darah tepi pasien CLL dan mungkin merupakan sebagian besar sel leukosit pada SADT tersebut. Mempersiapkan SADT dengan tangan dibandingkan dengan metode otomatis, atau menambahkan albumin ke dalam darah, menghilangkan kecenderungan sel CLL untuk hancur, sehingga memungkinkan penghitungan diferensial sel leukosit yang lebih akurat. *Smudge cells* sama sekali tidak spesifik untuk CLL dan sering terlihat terkait dengan sel limfoma lain yang bersirkulasi, sel blas, atau bahkan limfosit reaktif atipikal.

Prolimfosit mewakili komponen sel yang berproliferasi pada CLL dan biasanya ditemukan dalam jumlah rendah di darah tepi. Prolimfosit berukuran 1,5–2 kali diameter limfosit kecil dan memiliki inti bulat, kromatin inti yang agak tersebar (kurang

terkondensasi dibandingkan limfosit kecil tetapi tidak terdispersi halus dibandingkan dengan sel blas), dan anak inti sentral yang menonjol; sitoplasma cukup lebar dan biasanya sitoplasma basofilik pucat.

Meskipun prolimfosit jarang terdapat dalam darah tepi pada sebagian besar kasus CLL, prolimfosit harus dihitung dengan cermat satu per satu, karena peningkatan jumlah prolimfosit berhubungan dengan penyakit yang lebih agresif. Jika prolimfosit meliputi lebih dari 55% limfosit yang bersirkulasi, diagnosis leukemia prolimfositik sel B dapat ditegakkan.

### 3. ANEMIA APLASTIK

Penyebab utama *acquired* anemia aplastik dijelaskan pada tabel 3<sup>4</sup>

**Tabel 3. Penyebab Utama *Acquired* Anemia Aplastik**

<i>Idiopathic (70% of all aplastic anemia)</i>
<i>Cytotoxic drugs and radiation</i>
• Drugs
– Antibiotics: Chloramphenicol, sulfonamides
– Anticonvulsants: Felbamate, carbamazepine, phenytoin, valproic acid, phenytoin, nifedipine
– Anti-inflammatory: Phenylbutazone, indomethacin
• Chemicals: Industrial chemicals such as benzene, and pesticides
• Radiation
<i>Viral infections</i>
• Parvovirus B19
• Hepatitis A, B, G
• Human immunodeficiency virus infection (HIV)
• Epstein-Barr virus (EBV), cytomegalovirus (CMV)
<i>Immune disorders including autoimmune diseases</i>
• Eosinophilic fasciitis
• Systemic lupus erythematosus
• Graft-versus-host disease (GvHD), including transfusion-related GvHD
<i>Miscellaneous</i>
• Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH)
• Thymoma, thymic carcinoma
• Pregnancy

Tanda dan gejala klinis dari *acquired* AA bervariasi. Onset penyakit sering kali tidak disadari, dan gejala awalnya biasanya berhubungan dengan anemia atau

pendarahan, dan infeksi. Anemia biasanya normositik tetapi kadang-kadang dapat makrositik, dan berhubungan dengan retikulositopenia absolut.

Infeksi biasanya disebabkan oleh bakteri, termasuk sepsis, pneumonia, dan infeksi saluran kemih. Pasien biasanya tidak mengalami splenomegali atau limfadenopati. Tes serologi untuk hepatitis dan virus patogen lainnya, seperti virus Epstein-Barr (EBV), cytomegalovirus (CMV), dan human immunodeficiency virus (HIV), dan evaluasi penyakit autoimun mungkin bisa membantu. Namun, hubungan antara timbulnya AA dan paparan terhadap agen penyebab sangat bervariasi, dan pada banyak pasien, penyebabnya tidak pernah teridentifikasi.

Biopsi sumsum tulang (BM) diperlukan untuk menilai selularitas BM. Biasanya AA yang tidak parah (*moderate*) memiliki selularitas yang lebih rendah dari selularitas sesuai usia, seringkali <50% pada anak-anak dan <30% pada orang dewasa, sedangkan AA yang parah dan sangat parah memiliki selularitas <25% (Tabel 4). Biopsi BM yang khas menunjukkan hiposelularitas berat dengan penurunan hematopoiesis trilineage

*Erythroid islands* umumnya kecil jika ada. Megakariosit mungkin sulit ditemukan. Selain itu, terdapat peningkatan relatif pada limfosit kecil, sel plasma, sel stroma, dan sel mast. Pada beberapa pasien dengan AA parah dan sangat parah, selularitas BM mungkin lebih tinggi dari 30%, namun sebagian besar terdiri dari sel-sel inflamasi daripada sel hematopoietik. Aspirasi BM seringkali hiposeluler, mengandung spikula aseluler.

**Tabel 4. Klasifikasi Anemia Aplastik<sup>4</sup>**

	Moderate (or non-severe) AA	Severe AA	Very severe AA
Cytopenia(s) defined as • HGB <10 g/L • ANC <1.5 × 10 <sup>9</sup> /L • Platelets <50 × 10 <sup>9</sup> /L	Two of the three cytopenias, no severe pancytopenia	Severe pancytopenia	Severe pancytopenia
- ANC (×10 <sup>9</sup> /L)	≥0.5	0.2–0.5	<0.2
- Platelets(×10 <sup>9</sup> /L)	Usually 80–100	Usually <20	
Reticulocytes (mL <sup>-1</sup> )	Usually 40–60,000	<40,000	
Bone marrow cellularity	Usually <30–50% in children and <30% in adults	<25% or, <50% but hematopoietic cells constitute <30% of cellularity	
Median survival and outcome	60–70 months, spontaneous recovery may occur	Most patients <12 months if untreated. Spontaneous recovery is unlikely	
Treatment	No consensus recommendations	Immunosuppressive therapy Hematopoietic cell transplantation	

HGB hemoglobin, ANC absolute neutrophil count

Pada AA, sel residual hematopoietik seringkali secara morfologi normal, namun dapat ditemukan beberapa diseritropoiesis ringan dengan maturasi megaloblastoid.

Megakariosit pada AA secara morfologis dalam batas normal, namun rendahnya jumlah megakariosit di sumsum tulang dapat membuat evaluasi displasia megakariositik menjadi sulit. Sejumlah temuan sumsum tulang dapat membantu dalam diagnosis banding AA versus MDS hipoplastik (Tabel 5).

**Tabel 5. Perbedaan Anemia Aplastik Vs MDS Hipoplastik Pada Pemeriksaan Sumsum Tulang<sup>4</sup>**

	Aplastic anemia	Hypoplastic MDS
<i>Bone marrow examination</i>		
• Erythroid precursors	Lack, or very small erythroid clusters (often <10 cells/cluster), dyserythropoiesis either absent or mild	Patchy distribution of erythroid clusters, left shifted. Dyserythropoiesis is often seen
• Megakaryocytes	Often absent, or too few to assess morphology	Reduced, but more easily identifiable with dysplastic features
• Myeloid cells	Decreased, dysgranulopoiesis often absent	Decreased, more pronounced dysplasia
• Increased mast cells, lymphocytes, plasma cells	Often present	Often present
• Reticulin fibrosis	Absent	Can be present in 20% cases

AA idiopatik juga harus dibedakan dari mielosupresi *transient* yang disebabkan oleh obat, toksin, atau infeksi. Pada sitopenia *transient* dengan sumsum tulang hiposeluler, penelusuran riwayat klinis sangat penting dalam mengidentifikasi *agent* penyebab; pada beberapa kasus, sitopenia sembuh secara spontan tanpa teridentifikasi penyebab yang mendasarinya, yang kemungkinan merupakan infeksi virus yang tidak diketahui. Untuk menyingkirkan kemungkinan proses hipoplastik *transient* karena faktor eksogen, direkomendasikan bahwa diagnosis AA hanya boleh dipertimbangkan jika terdapat sitopenia yang persisten dan telah dilakukan pemeriksaan klinis dan laboratorium yang ekstensif dan menyeluruh.

#### 4. MYELODYSPLASTIC SYNDROMES

*Myelodysplastic syndromes* (MDS) adalah neoplasma hematopoietik klonal yang ditandai dengan sitopenia perifer progresif dan morfologi displastik sel hematopoietik.

Untuk mengevaluasi kasus potensial MDS, pemeriksaan minimal yang diperlukan adalah CBC (*Complete Blood Count*, Pemeriksaan Darah Lengkap) dengan hitung jenis leukosit; evaluasi sediaan apus darah tepi, evaluasi sediaan aspirasi sumsum tulang dengan pewarnaan Wright-Giemsa, biopsi sumsum tulang, dan pewarnaan besi pada



sedaspirasi sumsum tulang untuk mengevaluasi *ring* sideroblas; dan kariotipe sumsum tulang.

Pedoman MDS WHO tahun 2016 menentukan ambang batas sitopenia ialah kadar hemoglobin <10 g/dL, jumlah neutrofil absolut <1,8 × 10<sup>9</sup> /L, dan jumlah trombosit <100 × 10<sup>9</sup> /L, namun diketahui bahwa diagnosis MDS mungkin dapat ditegakkan pada pasien dengan sitopenia yang lebih ringan (di bawah kisaran nilai referensi untuk masing-masing laboratorium), asalkan sitopenia tersebut persisten dan tidak dapat dijelaskan dan jika terdapat kriteria diagnostik lainnya. Pasien biasanya datang dengan anemia yang seringkali makrositik, kadang normositik, dan jarang mikrositik. Seringkali terjadi peningkatan RDW. Anemia sering disertai dengan neutropenia dan/atau trombositopenia dan pasien jarang datang hanya dengan neutropenia atau trombositopenia tanpa anemia.

Meskipun terdapat sitopenia perifer, sumsum tulang biasanya hiperseluler, kadang normoseluler dan pada sekitar 10-15% kasus sumsum tulang hiposeluler. Hiposeluleritas lebih sering ditemukan pada MDS pediatrik, pasca anemia aplastik sebelumnya, dan pada MDS *therapy-related*

Meskipun tidak patognomonik untuk MDS, morfologi displastik merupakan ciri penting dalam menegakkan diagnosis. Temuan displastik pada MDS tercantum pada Tabel 6

**Tabel 6. Morfologi Displastik pada MDS<sup>4</sup>**

Cell lineage	Peripheral blood	Bone marrow
Red blood cells and erythroids	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Macrocytes</li> <li>• Basophilic stippling</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Megaloblastoid change</li> <li>• Nuclear budding or other irregularities</li> <li>• Multinucleation</li> <li>• Vacuolated early erythroblasts</li> <li>• Internuclear bridging</li> <li>• Pyknotic nuclei</li> <li>• Ring sideroblasts</li> </ul>
Granulocytes	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Pseudo-Pelger-Huët anomaly</li> <li>• Non-segmented nuclei</li> <li>• Abnormal chromatin clumping</li> <li>• Hypogranulation</li> <li>• Uneven granulation</li> <li>• Nuclear hypersegmentation</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Same abnormalities as seen in blood</li> <li>• Abnormal localization of immature precursors in clusters away from bone trabeculae</li> </ul>
Platelets and megakaryocytes	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Large, vacuolated, or hypogranular platelets</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Small mononuclear forms (micromegakaryocytes)</li> <li>• Large forms with multiple small, rounded nuclei</li> <li>• Forms with hypolobated nuclei</li> <li>• Forms with hyperchromic nuclei and scant cytoplasm</li> </ul>



Beberapa ciri displastik paling jelas terlihat pada apusan tepi, seperti anomali pseudo-Pelger-Huët dan sitoplasma hipogranular pada neutrofil, sementara ciri lainnya lebih terlihat pada sumsum tulang.

Sel blas pada sumsum tulang meningkat pada beberapa kasus MDS dan mungkin ditemukan sel blas di darah tepi, namun selalu <20% dari sumsum tulang dan sel berinti di darah tepi. Jarang ditemukan Auer rod, namun jika ada, mengindikasikan penyakit *high-grade* (MDS with Excess blasts)

Klasifikasi WHO tahun 2016 merekomendasikan bahwa untuk dianggap signifikan, setidaknya terdapat 10% sel dalam suatu *lineage* menunjukkan ciri-ciri displastik. Namun, gambaran displastik yang melibatkan >10% *lineage* hematopoietik juga dapat ditemukan pada individu normal dan bahkan lebih sering terlihat pada pasien dengan sitopenia reaktif. Jadi, bahkan jika perubahan displastik morfologis yang signifikan teridentifikasi pada pasien sitopenia, kemungkinan penyebab sekunder dari sitopenia dan displasia hematopoietik harus disingkirkan secara hati-hati sebelum menegakkan diagnosis MDS. Pewarnaan besi harus dilakukan untuk mengevaluasi cincin sideroblas pada apusan aspirasi sumsum tulang

## 5. ESSENTIAL THROMBOCYTHEMIA (ET)

*Essential thrombocythemia* (ET) adalah neoplasma mieloproliferatif BCRABL1-negatif yang terutama memanifestasikan morfologi abnormal pada *lineage* megakariositik dan ditandai dengan trombositosis  $\geq 450 \times 10^9 /L$

### Morfologi

Sediaan apus darah tepi pada ET terdapat trombositosis yang nyata dengan anisositosis trombosit. *Mean platelet volume* (MPV) umumnya lebih rendah dari trombositosis normal atau reaktif, tetapi *mean platelet width* umumnya meningkat. Biasanya tidak terdapat leukositosis, tidak terdapat pergeseran granulositik ke kiri atau displasia, dan tidak terdapat basofilia absolut atau relatif.

Eritrosit normositik dan normokromik, kecuali pada pasien dengan perdarahan signifikan dan defisiensi zat besi, ditemukan eritrosit hipokromik dan mikrositik. Temuan bentuk *teardrop* (tetesan air mata / *dacrocyte*) dan gambaran leukoeritroblastik meningkatkan kecurigaan PMF atau proses fibrotik sumsum tulang lainnya dibanding ET.

Biopsi sumsum tulang penting untuk mendiagnosis ET dan membedakannya dari PMF dini/prefibrotik, PV, MPN lain, dan neoplasma mieloid lain yang berhubungan dengan trombositosis serta trombositosis reaktif. Sumsum tulang pada ET umumnya normoseluler dengan eritropoiesis dan granulopoiesis normal. Perubahan penting terjadi pada megakariosit yang abnormal tetapi menunjukkan ciri-ciri yang berbeda dari PV, PMF, dan CML. Pada ET, megakariosit umumnya berukuran besar, dengan inti hiperlobulasi atau inti “berbentuk staghorn”, dan memiliki sitoplasma yang melimpah/lebar, sering kali ditemukan sel hematopoietik lain di dalam sitoplasma megakariosit (emperipoiesis). Megakariosit tersebar atau secara fokal membentuk cluster longgar. Bentuk inti *bizarre* dengan kromatin hiperkondensasi dan cluster yang rapat merupakan ciri khas PMF, sedangkan megakariosit kecil dengan inti hipolobasi merupakan ciri khas CML dan ciri-ciri ini tidak konsisten dengan ET. Proliferasi granulositik biasanya tidak ada atau, jika ada, hanya minimal, dan tidak ada pergeseran ke kiri atau peningkatan sel blas.

### **Diagnosis banding**

Diagnosis ET memerlukan trombositosis yang berkelanjutan ( $\geq 450 \times 10^9 /L$ ); mengidentifikasi temuan morfologi BM yang konsisten dengan penyakitnya; tidak termasuk MPN, MDS, atau neoplasma myeloid lainnya yang terkait dengan peningkatan trombosit; dan menunjukkan mutasi JAK2, CALR, atau MPL atau kelainan sitogenetik. Dengan tidak adanya abnormalitas molekuler dan sitogenetik ini, diagnosis ET dapat dibuat dengan hati-hati menyingkirkan trombositosis reaktif dan neoplasma myeloid lain yang berhubungan dengan trombositosis.

Kriteria diagnostik sesuai WHO 2016 ditunjukkan pada Tabel 7.

**Tabel 7. Kriteria Diagnostik ET. Diagnosis ET Memerlukan Semua 4 Kriteria Mayor atau 3 Kriteria Mayor Pertama dan 1 Kriteria Minor<sup>4</sup>**

<i>Major criteria</i>
• Platelet count $\geq 450 \times 10^9/L$
• Bone marrow: normocellular bone marrow with a megakaryocytic proliferation of enlarged, mature megakaryocytes with hyperlobulated nuclei. No significant increase in left-shifted neutrophilic granulopoiesis or erythropoiesis and no or rarely minimal increase in reticulin fibrosis (up to grade 1)
• Not meeting the WHO criteria for <i>BCR-ABL1</i> -positive CML, PV, PMF, MDS, or other myeloid neoplasms
• Presence of <i>JAK2</i> , <i>CALR</i> , or <i>MPL</i> mutation
<i>Minor criteria</i>
• Presence of a clonal marker or absence of evidence of reactive thrombocytosis

Diagnosis banding ET meliputi kondisi reaktif yang menyebabkan peningkatan jumlah trombosit, MPN lain yang menyebabkan peningkatan jumlah trombosit, dan jarang AML, MDS, atau MDS/MPN yang berhubungan dengan peningkatan trombosit. Trombositosis reaktif/sekunder dapat disebabkan oleh infeksi, penyakit inflamasi, kehilangan darah dan defisiensi zat besi kronis, keganasan, trauma dan pembedahan (terutama splenektomi), dan *rebound* setelah kemoterapi atau terapi defisiensi B12 atau folat. Kondisi reaktif lebih sering dikaitkan dengan peningkatan reaktan fase akut seperti *C-reactive protein* (CRP). Kondisi reaktif tidak menetap atau tidak berhubungan dengan splenomegali, dan kemungkinan besar tidak terkait dengan riwayat episode trombotik.

Leukemia mieloid kronis (CML) sering kali muncul dengan trombositosis, namun ciri utama CML adalah proliferasi myeloid. Darah tepi menunjukkan leukositosis dengan banyak mielosit dan basofilia, yang biasanya cukup khas dan bukan merupakan ciri pada ET. Selain itu, megakariosit “dwarf” kecil di sumsum tulang juga sangat berbeda dari megakariosit *staghorn-like* yang lebih besar di ET. CML adalah entitas yang ditentukan secara genetik, dan deteksi t(9;22) atau BCR-ABL1 akan memperjelas diagnosis banding ini. Beberapa pasien dengan CML dengan trombosit yang sangat tinggi mungkin memiliki transkrip fusi BCR-ABL1 p230, dan kasus ini mungkin mirip ET.

MDS *with isolated del(5q)* dapat menunjukkan peningkatan trombosit, namun pasien hampir selalu mengalami anemia. Megakariosit sumsum tulang berukuran kecil

dan mengalami hipolobasi/monolobasi, sangat berbeda dengan megakariosit hiperlobulasi besar yang terlihat pada ET.

Leukemia mieloid akut (AML) terkadang muncul dengan peningkatan trombosit; khususnya AML dengan inv(3)(q21;q26.2) atau t(3;3) (q21;q26.2) atau pada beberapa leukemia megakaryoblastik. Selain temuan sitogenetik abnormal yang jelas, pasien tersebut akan mengalami peningkatan sel blas dan biasanya menunjukkan megakariosit yang sangat displastik, termasuk mikromegakariosit klasik yang membuatnya mudah dibedakan dari ET.

Pasien PV sering mengalami trombositosis saat datang; dalam kasus yang disebut PV “masked” dimana hemoglobin dan hematokrit hanya sedikit meningkat, gambaran laboratorium mirip dengan ET.

Selain itu, kasus ET dengan mutasi JAK2 seringkali memiliki kadar hemoglobin yang lebih tinggi dibandingkan kasus ET dengan mutasi CALR atau MPL.

Ada sejumlah fitur yang membantu dalam diagnosis banding antara ET dan PV:

- (1) PV memiliki rasio hemoglobin/hematokrit yang tinggi;
- (2) Sumsum tulang pada PV menunjukkan hiperseluleritas dengan panmyelosis;
- (3) Megakariosit pada PV bersifat pleomorfik, dengan beberapa sel yang tampak normal  
bercampur dengan sel bentuk besar, berbeda dengan ET dimana ditemukan megakariosit yang membesar secara lebih uniform
- (4) PV sering mengalami mutasi JAK2 biallelik;
- (5) PV negatif untuk mutasi MPL515W atau CALR.

Diagnosis banding yang paling sulit adalah antara ET dan fase prefibrotik dari PMF. Fitur yang membedakan kedua entitas ini ditunjukkan pada Tabel 8.

**Tabel 8. Gambaran Klinikopatologis ET versus Fase Prefibrotik dari PMF<sup>4</sup>**

Features	ET	Prefibrotic PMF
<b>Peripheral blood</b>		
WBC	Usually normal, left-shifted granulocytes not seen	Variable, often increased with left-shifted granulocytes
Platelets	Increased ( $\geq 450 \times 10^9/L$ )	Often $\geq 450 \times 10^9/L$ , may be normal or decreased
Anemia	No	May present
<b>Bone marrow</b>		
Cellularity	Usually normal	Increased
Megakaryocyte clustering, size, maturation, and nuclear shape	Mostly large, giant, mature, hyperlobulated, staghorn forms. Dispersed or loose clusters	Variable in size from small to large, immature to mature with hyperchromatic forms, some bizarre and bulbous forms. Tight clusters, endosteal translocation may be seen
M/E ratio	Often normal, no significant increase in granulo- and erythropoiesis	Increased, pronounced myeloid hyperplasia
Fibrosis	No	No or minimal to mild (MF0 and MF1)
<b>Splenomegaly</b>	No	No or minimal to mild enlarged
<b>LDH</b>	Normal	Normal or minimal to mildly elevated

ET essential thrombocythemia, PMF primary myelofibrosis

## 6. POLYCYTHEMIA VERA / POLISITEMIA VERA (PV)

Eritrositosis primer terjadi akibat defek genetik pada prekursor sumsum tulang yang mendorong peningkatan produksi eritrosit. Perubahan genetik ini bisa bersifat kongenital atau didapat. Penyebab paling umum dari eritrositosis primer adalah polisitemia vera (PV), suatu MPN yang berkembang karena mutasi tirosin kinase JAK2 sitoplasmik yang menyebabkan hipersensitivitas terhadap sitokin dan proliferasi semua *lineage* hematopoietik.

Kebanyakan pasien PV tidak menunjukkan gejala, dan diagnosis dapat dicurigai dengan ditemukannya peningkatan jumlah sel dan splenomegali pada pemeriksaan atau abnormalitas pada pemeriksaan darah rutin yang, selain peningkatan hemoglobin dan hematokrit, sering kali juga disertai leukositosis dan/atau trombositosis. Penyebab utama morbiditas dan mortalitas PV ialah karena komplikasi hiperviskositas darah, yang berasal dari peningkatan *Red cell Mass* (RCM) dan berkontribusi terhadap peningkatan risiko trombosis vena dan arteri. Komplikasi tersebut antara lain hipertensi, fenomena Raynaud, klaudikasio, gangren perifer, sindrom Budd-Chiari, infark miokard, dan cedera serebrovaskular. Komplikasi hemoragik lebih jarang terjadi. Gejala umum lainnya termasuk sakit kepala, pusing, pruritus, atau keluhan perut terkait splenomegali

Diagnosis PV didasarkan pada kriteria klasifikasi WHO yang mencakup temuan klinis, laboratorium, morfologi, dan genetik (Tabel 9).

**Tabel 9. Kriteria WHO 2016 untuk PV<sup>4</sup>**

<b>Major criteria</b>
1. HGB >16.5 g/dL in men and >16.0 g/dL in women
Or
Hematocrit >49% in men and >48% in women
Or
Increased red cell mass (>25% above mean normal predicted value)
2. Bone marrow biopsy showing hypercellularity for age with trilineage growth (panmyelosis) including prominent erythroid, granulocytic and megakaryocytic proliferation with pleomorphic, mature megakaryocytes (different in size)
3. Presence of <i>JAK2 V617F</i> or <i>JAK2</i> exon 12 mutation
<b>Minor criterion</b>
Subnormal serum erythropoietin levels

Diagnosis of PV requires meeting either all three major criteria or the first two major criteria and the minor criterion

Tahap awal PV (juga dikenal sebagai “masked PV”) mungkin memiliki nilai hemoglobin dan hematokrit yang sedikit lebih tinggi; seperti pasien mungkin salah didiagnosis sebagai trombotemia esensial (ET), terutama bila pasien menunjukkan jumlah trombosit yang sangat tinggi, dan diagnosis yang benar memerlukan biopsi sumsum tulang. Untuk menjangkau pasien-pasien ini dengan lebih baik, WHO telah menurunkan tingkat hemoglobin dan hematokrit dan memasukkan evaluasi biopsi sumsum tulang sebagai persyaratan untuk pemeriksaan PV. Sebagian besar pasien PV datang dalam fase polisitemia yang berhubungan dengan peningkatan RCM secara signifikan yang menyebabkan peningkatan nilai hematokrit yang nyata, sering kali mencapai nilai di atas 60%, leukositosis lebih besar dari  $10 \times 10^9/L$ , dan trombotosis lebih besar dari  $450 \times 10^9/L$ .

### **Morfologi**

Oleh karena produksi eritrosit yang berlebihan menghabiskan simpanan zat besi, eritrosit menjadi mikrositik dan hipokromik. Tahap MF pasca-PV dikaitkan dengan apusan darah tepi leukoeritroblastik yang menunjukkan adanya sel myeloid bergeser ke kiri, sel blas, eritrosit berinti, dan eritrosit yang berbentuk aneh dengan berbagai bentuk *tear-drop*.

Biopsi sumsum tulang telah menjadi persyaratan untuk pemeriksaan PV dan harus mencakup penilaian seluleritas dengan fokus pada *lineage* apa yang hiperplastik, morfologi megakariosit, adanya *cluster* megakariosit, adanya fibrosis (retikulin dan kolagen) dan/atau osteosklerosis, dan penghitungan sel blas. Evaluasi sistematis ini



membantu menegakkan diagnosis, menyingkirkan neoplasma mieloproliferatif lainnya, dan menentukan stadium penyakit serta prognosis.

Tahap awal/pra-polisitemia dan polisitemia pada PV menunjukkan temuan morfologi serupa yaitu hiperselularitas menurut usia, hiperplasia trilineage, dan megakaryosit pleomorfik yang mungkin terjadi pada *cluster* longgar. Beberapa pasien, terutama pasien dengan peningkatan megakariosit yang nyata, mungkin mengalami fibrosis sumsum tulang yang parah

Tidak ada peran imunofenotipe atau sitokimia dalam diagnosis PV. Pemeriksaan sitogenetika dan Genetika Molekuler Mutasi JAK2 V617F terjadi pada lebih dari 95% pasien PV dan mewakili kriteria utama ketiga untuk diagnosis PV. Adanya mutasi tersebut menunjukkan adanya hematopoiesis klonal tetapi tidak spesifik untuk PV, karena mutasi yang sama juga dapat terjadi pada neoplasma mieloproliferatif lainnya, khususnya ET dan mielofibrosis primer.

### **Diagnosis banding**

Pendekatan terhadap pasien dengan eritrositosis harus mencakup riwayat klinis, pemeriksaan laboratorium, dan, dalam beberapa kasus, pengujian genetik untuk mengevaluasi eritrositosis sekunder. Temuan Epo serum yang menurun atau di bawah normal cukup spesifik untuk PV dan membantu menegakkan diagnosis dalam keadaan mutasi JAK2 +. Namun, kadar Epo mungkin normal, terutama pada tahap awal PV (pra-polisitemik atau 'masked' PV ), yang memerlukan penyelidikan lebih lanjut mengenai eritrositosis. Adanya leukositosis dan trombositosis, splenomegali, dan JAK2 V617F yang menyertainya atau kelainan genetik klonal lainnya membantu menyingkirkan penyebab sekunder eritrositosis namun tidak membedakan antara PV dan MPN lainnya, terutama ET dan primer awal/pra-fibrotik mielofibrosis (PMF).

Perbedaan antara PV, ET dan PMF bergantung pada evaluasi morfologi yang cermat terhadap biopsi sumsum tulang, yang telah menjadi kriteria utama yang diwajibkan dalam revisi klasifikasi WHO tahun 2016 (tabel 10).



**Tabel 10. Perbedaan PV, ET dan PMF<sup>4</sup>**

	Masked PV	PV	PMF	Early PMF	ET
<b>Clinical features</b>					
Symptoms	Asymptomatic	Increased BP pruritus	Splenomegaly	Asymptomatic	Asymptomatic
<b>Laboratory features</b>					
• HCT/HGB	Normal/ increased	Increased	Low	Normal/low	Normal
• Platelets	Increased	Increased	Low	Increased	Increased
• WBC	Increased	Increased	Increased/low/ normal	Increased	Normal
• Epo	Normal/ subnormal	Low	Normal	Normal	Normal
<b>Mutations</b>					
• <i>JAK2</i>	V617F or exon 12	V617F or exon 12	Often V617F	Often V617F	Often V617F
• <i>CALR</i>	None	None	Often mutated	Often mutated	Often mutated
• <i>MPL</i>	None	None	Occasionally mutated	Occasionally mutated	Occasionally mutated
<b>Bone marrow morphology</b>					
• Erythroid proliferation	Present	Present	Absent	Absent	Absent
• Myeloid proliferation	Present	Present	Present	Present	Absent
• Megakaryocytic proliferation	Present	Present	Present	Present	Present
• Megakaryocyte morphology	Pleomorphic	Pleomorphic	Bulbous	Bulbous	Large, staghorn
• Megakaryocyte clusters	Absent	Absent	Present, tight	Present, tight	Present, loose
• Fibrosis	MF0	MF0-1	MF2-3	MF0-1	MF0

*BP* blood pressure, *HCT* hematocrit, *HGB* hemoglobin, *MF* myelofibrosis grades 0–3, *Epo* erythropoietin, *WBC* white blood cells, *ET* essential thrombocythemia, *PMF* primary myelofibrosis

## DAFTAR PUSTAKA

1. Haferlach T, Schmidts I. The power and potential of integrated diagnostics in acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol*. 2020 Jan;188(1):36-48.
2. Ladines-Castro W, et al. Morphology of leukaemias. *Rev Med Hosp Gen Méx*. 2016;79(2): 107-13.
3. Sekar MD, Raj M, Manivannan P. Role of Morphology in the Diagnosis of Acute Leukemias: Systematic Review. *Ind J Med Paediatr Oncol Article published online: 2023-04-17*.
4. Wang SA, Hasserjian RP eds. *Diagnosis of Blood and Bone Marrow Disorders*. Cham-Switzerland : Springer International Publishing AG ; 2018
5. Deininger MW. Diagnosing and managing advanced chronic myeloid leukemia. *Am Soc Clin Oncol Educ Book*. 2015:e381-8.

### 5.3. Reporting of Blood Smear and Bone Marrow Aspiration

Fridayenti

KSM Patologi Klinik Rumah Sakit Umum Daerah Arifin Achmad Provinsi Riau  
/Fakultas Kedokteran Universitas Riau 2023

#### I. Pendahuluan

Evaluasi sumsum tulang (SST) berperan penting dalam diagnosis, menentukan stadium dan monitoring berbagai penyakit sistem hematolimfoid. Prosedur pengambilan berupa aspirasi sumsum tulang cair dan mendapatkan jaringan sumsum tulang menggunakan jarum khusus. Aspirasi dan biopsi sumsum tulang terutama dilakukan untuk penilaian sitologik dan juga untuk pemeriksaan imunofenotipe, sitogenetik, genetik molekular dan investigasi khusus lainnya. Aspirasi sumsum tulang harus dilakukan oleh tenaga medis terlatih yang mengerti indikasi, kontraindikasi, bahaya dan harus mengikuti prosedur operasi standar.<sup>1,2</sup>

Krista iliaka posterior merupakan tempat pengambilan yang paling direkomendasikan demi kenyamanan dan keselamatan pasien, sementara krista iliaka anterior dan sternum merupakan tempat pengambilan alternatif. Sediaan hapus aspirat sumsum tulang dan jika memungkinkan sediaan partikel kasar sumsum tulang harus dibuat dan diberi label. Sewaktu sediaan hapus sudah kering, harus difiksasi dan diwarnai dengan pewarnaan *Wright-Giemsa* atau pewarnaan lain yang direkomendasikan. Sediaan hapus sumsum tulang harus dinilai dan dilaporkan secara sistematis sehingga tidak ada hal penting yang terlewatkan, menggunakan lensa obyektif rendah, menengah dan tinggi. Interpretasi akhir memerlukan integrasi hasil pemeriksaan darah tepi, aspirat sumsum tulang dan biopsi bersama hasil tes tambahan lainnya seperti imunofenotipe, sitogenetik dan genetik molekular sesuai temuan klinis dan diagnostik lainnya. Laporan harus ditandatangani atau otorisasi komputer menggunakan *password* yang aman dan rahasia.<sup>1,2</sup>

#### II. Laporan Sediaan Hapus Darah Tepi

Hasil pemeriksaan hematologi yang abnormal baik kualitatif dan kuantitatif memerlukan evaluasi sediaan hapus darah tepi. Pemeriksaan dan pewarnaan sediaan hapus yang dilakukan dengan baik dikombinasikan dengan informasi hasil darah lengkap dan kemampuan petugas yang membaca menambah informasi kualitatif dan atau

kuantitatif, merupakan bagian penting diagnosis. Pelaporan hasil yang abnormal dilakukan dengan beberapa cara: deskripsi sederhana yaitu ada atau tidak, semikuantitatif ringan (+), moderat (++) dan berat (+++), kuantitatif berupa persentase abnormalitas morfologi, normal (<5%), ringan (5-25%), moderat (25- 50%) dan berat (>50%).<sup>3</sup>

Format pelaporan khusus memuat biodata pasien, nomor rekam medik, dokter yang meminta, tanggal permintaan dan pelaporan, data klinis pasien. Isi laporan meliputi karakteristik setiap seri sel hematopoietik utama yaitu eritrosit, leukosit dan trombosit diikuti kesimpulan dari temuan berupa diagnosis dan diagnosis banding, evaluasi laboratorium lain yang direkomendasikan dan ditandatangani oleh dokter yang memeriksa disertai tanggal laporan.<sup>4</sup> Kriteria penilaian dapat dilihat pada tabel 1.<sup>3</sup>

**Tabel 1. Tabel Penilaian Morfologi Sediaan Hapus Darah Tepi**

Nama Sel	Sistem Penilaian		
	Sedikit /1+	Moderat/2+ (%)	Banyak/3+ (%)
<b>Eritrosit</b>			
Anisositosis	N/A	11-20	>20
Makrosit	N/A	11-20	>20
Makrosit Oval	N/A	2-5	>5
Mikrosit	N/A	11-20	>20
Sel Hipokromik	N/A	11-20	>20
Polikromasi	N/A	5-20	>20
Akantosit	N/A	5-20	>20
Sel Cubit	N/A	1-2	>2
Sel Blister	N/A	1-2	>2
Ekinosit	N/A	5-20	>20
Eliptosit	N/A	5-20	>20
Irreguler Contracted cells	N/A	1-2	>2
Ovalosit	N/A	5-20	>20
Skistosit	<1%	1-2	>2
Sel Sabit	N/A	1-2	>2
Sferosit	N/A	5-20	>20
Stomatosit	N/A	5-20	>20
Sel Target	N/A	5-20	>20
Tear Drop cells	N/A	5-20	>20
Basophilic stippling	N/A	5-20	>20
Howell-Jolly Bodies	N/A	2-3	>3
Pappenheimer Bodies	N/A	2-3	>3
<b>Lekosit</b>			
Dohle bodies	N/A	2-4	>4
Vakuolisasi (neutrofil)	N/A	4-8	>8
Hipogranulasi (neutrofil)	N/A	4-8	>8
Hipergranulasi (neutrofil)	N/A	4-8	>8
<b>Trombosit</b>			
Trombosit <i>Giant</i>	N/A	11-20	>20

## 2.1. Sel Darah Merah

Penilaian eritrosit meliputi warna, bentuk, pinggir regular/irregular dan adanya inti, badan inklusi atau parasit. Pada sediaan hapus darah tepi, ukuran eritrosit rata-rata 7,5 um, bentuk bundar atau sedikit oval dengan area pucat pada sepertiga tengah sel. Penilaian eritrosit secara mikroskopik dan identifikasi abnormalitas ukuran, bentuk dan warna eritrosit serta adanya badan inklusi masih merupakan cara yang fundamental dalam identifikasi abnormalitas morfologik yang berguna dalam diagnosis. Minimal 1000 eritrosit harus dinilai untuk menentukan secara tepat persentase sel eritrosit yang abnormal. Rekomendasi umum yang dikeluarkan oleh *The International Council for Standardization in Hematology (ICSH)* hanya laporan kualitatif untuk menentukan abnormalitas eritrosit.<sup>3,5</sup>

### 2.1 Leukosit

Penilaian sel leukosit meliputi adanya sel imatur, lobulasi abnormal atau kontur nuklear, abnormal atau hilangnya granulasi, adanya parasit atau inklusi yang lain. Spektrum penilaian adalah leukosit matang meliputi limfosit, netrofil dan monosit.<sup>3,5</sup>

### 2.2 Trombosit

Penilaian trombosit adalah menilai penurunan dan peningkatan jumlah dan ukuran, tidak adanya granul, terdapatnya agregasi trombosit dan fragmen megakariosit. Trombosit normal berukuran 1,5-3 um, trombosit besar berukuran 3-7 um (sama dengan ukuran eritrosit normal) sementara trombosit *giant* lebih besar dari ukuran eritrosit yaitu 10-20 um. Pada orang normal, biasanya jumlah trombosit besar <5%. Ukuran trombosit bertambah secara bertahap selama penyimpanan dalam tabung darah dengan antikoagulan EDTA. Direkomendasikan penilaian trombosit *giant* dan komentar tentang adanya trombosit hipogranular. Komentar tentang adanya megakarioblas, megakariosit dan mikromegakariosit perlu dibuat pada penilaian sediaan hapus darah tepi jika terlihat.<sup>3,5</sup>

## III. Laporan Aspirasi Sumsum Tulang

Metoda preparasi, prosesi dan laporan spesimen aspirasi sumsum tulang sangat bervariasi. Perbedaan ini menyebabkan diagnosis dan klasifikasi tidak konsisten sehingga dapat mempengaruhi terapi dan luaran pasien. Perlu standarisasi spesimen sumsum tulang dan pelaporannya. *The International Council for Standardization in Hematology* mengeluarkan panduan tentang hal ini. Laporan aspirasi sumsum tulang harus memuat informasi yang terdapat pada tabel 2.<sup>6</sup>

## **Tabel 2. Laporan Aspirasi Sumsum Tulang**

Nama Institusi Nomor  
laboratorium

Data pasien : Nama, nomor rekam medik, tanggal lahir, jenis kelamin, alamat , nomor telepon dan lainnya

Nama dokter penanggung jawab Nama

dokter yang meminta Tanggal

pemeriksaan dilakukan

Riwayat klinis penting seperti hasil pemeriksaan fisik, kemo/radioterapi terbaru, terapi sitokin dan hasil  
laboratorium yang berkaitan

Indikasi pemeriksaan sumsum tulang Prosedur

: aspirasi/ biopsy trephine Lokasi/tempat

aspirasi/biopsi Aspirasi mudah/sulit

Hasil hematologi : Kadar hemoglobin, jumlah dan hitung jenis leukosit dan jumlah trombosit Hasil

sedimen hapus darah tepi dan kesimpulan diagnostik

Selularitas partikel dan sel Hitung

jenis sel berinti Jumlah sel yang

dihitung Ratio Mieloid : eritroid

Eritropoiesis

Mielopoiesis

Megakariosit Limfosit

Sel Plasma

Sel hematopoietik lain

Sel abnormal (sel blast, infiltrasi metastatik)

Pewarnaan besi

Sitokimia

Investigasi lain misal sitogenetik, PCR, FISH, mikrobiologi

Kesimpulan hasil flow cytometry jika ada

Kesimpulan

Klasifikasi WHO jika relevan Kode

penyakit

Tanda tangan dan tanggal laporan

---

### **3.1 Indikasi Pemeriksaan sumsum Tulang**

Indikasi evaluasi sumsum tulang dapat dikelompokkan menjadi beberapa kategori:<sup>7,8</sup>

- Anemia yang tidak dapat diterangkan
- Anemia makrositik (membedakan megaloblastik dan maturasi normoblastik)
- Leukopenia yang tidak dapat diterangkan
- Trombositopenia yang tidak dapat diterangkan
- Pansitopenia

- Evaluasi peningkatan hitung jumlah sel darah tepi yang tidak dapat diterangkan (misal polisitemia, trombositosi, leukositosis)
- Terdapat blast pada sediaan hapus darah tepi (investigasi leukemia)
- Terdapat sel *tear drop* pada sediaan hapus darah tepi (kemungkinan mielofibrosis)
- Terdapat sel *hairy* pada sediaan hapus darah tepi
- Curiga mieloma multipel
- Menentukan stadium limfoma non-Hodgkin dan tumor solid
- Splenomegali yang tidak dapat dijelaskan (kemungkinan limfoma)
- Curiga penyakit storage (misal penyakit Gaucher, Niemann-Pick)
- Demam yang tidak diketahui penyebabnya
- Curiga kelainan kromosomal pada neonatus (memerlukan konfirmasi cepat)
- Konfirmasi sumsum tulang normal pada donor alogenic potensial
- *Work up* amiloidosis (untuk mendeteksi kelainan sel plasma klonal)
- Penyakit sel Mast
- *Disseminated granulomatous disease*
- *Thrombotic Thrombocytopenic Purpura*
- Penyakit tulang metabolik
- *Follow up* terapeutik
  - Kemoterapi/transplantasi sumsum tulang pada neoplasma hematopoitik atau tumor sel kecil pada anak
  - Terapi sitopenia tertentu

### 3.2 Prosedur : Aspirasi/ Biopsi *Trephine*

Aspirasi dan biopsi *trephine* sumsum tulang memberikan informasi yang berguna dan saling melengkapi sehingga direkomendasikan melakukan keduanya secara rutin sehingga hasil yang didapat saling berkorelasi. Pada situasi klinis tertentu, aspirasi sumsum tulang saja cukup memadai. Jika biopsi *trephine* diperlukan tetapi tidak diperoleh sampelnya, direkomendasikan preparasi partikel *clot* dan apabila aspirat tidak diperoleh misal *dry tap*, *imprint trephine* harus dilakukan.<sup>9</sup>

### **3.3 Lokasi/Tempat Aspirasi/Biopsi**

Pada anak-anak, proses hematopoietik aktif tersebar pada tulang2 skleton tetapi pada orang dewasa hanya pada tulang aksial. Krista iliaka posterior merupakan lokasi yang optimal untuk aspirasi sumsum tulang karena nyaman, aman dan mudah dikerjakan. Dapat dilakukan pada semua umur, baik aspirasi maupun biopsi. Tempat alternatif lain jika krista iliaka tidak dapat dijangkau karena obesitas morbid, posisi pasien tidak nyaman, kulit rusak atau radiasi sebelumnya adalah krista iliaka anterior, sternum dan tibia. Krista iliaka anterior dilakukan pada bayi dan anak. Sternum hanya dilakukan pada remaja dan orang dewasa. Aspirasi pada sternum tidak boleh dilakukan pada bayi dan anak karena mempunyai komplikasi yang serius dan berbahaya. Aspirasi tibia hanya dilakukan pada bayi usia <18 bulan. Diluar usia ini mempunyai kortikal tulang yang keras, selularitas sumsum tulang normal yang sangat bervariasi sehingga sulit menterjemahkan selularitas sumsum tulang.<sup>7,8,10</sup>

### **3.4 Proses Aspirasi Sumsum Tulang**

Adekuat atau tidaknya aspirasi sumsum tulang harus dilaporkan. Apakah partikel ada/tidak pada sediaan hapus sumsum tulang (partikulat/apartikulat) atau jika aspirasi “dry tap” atau hemodilusi. *Dry tap* merupakan keadaan tidak terbawa sampel sumsum tulang sewaktu aspirasi sumsum tulang dilakukan (tidak ada spikula tulang pada spesimen) meskipun darah sumsum tulang mudah didapat. Terdapat sejumlah alasan yang menimbulkan keadaan ini; penyebab tersering adalah ujung jarum tidak masuk rongga sumsum tulang. Keadaan lain adalah sedikit atau tidak ada material yang dapat diaspirasi meskipun jarum dapat masuk kedalam rongga sumsum tulang karena selularitas sumsum tulang sangat berkurang (anemia aplastik, nekrosis sumsum tulang) atau sumsum tulang sangat hiperseluler (leukemia, limfoma) atau fibrosis (mielofibrosis, leukemia sel hairy) yang menyebabkan aspirasi tertahan. Jika terdapat *dry tap*, biopsi sumsum tulang harus dilakukan.<sup>6,8,9</sup>

### **3.5 Hasil Hematologi**

Pemeriksaan darah lengkap termasuk hitung jumlah trombosit dan retikulosit harus dilakukan pada hari yang sama dengan pemeriksaan aspirasi sumsum tulang dan hasilnya dimasukkan dalam laporan. Hitung jumlah retikulosit dapat berguna



khususnya menentukan apakah hiperplasia eritroid berhubungan dengan eritropoiesis efektif atau inefektif.<sup>4,6,11</sup>

### **3.6 Hasil Sediaan Hapus Darah Tepi dan Kesimpulan Diagnostik**

Pemeriksaan sediaan hapus darah tepi harus sudah dilakukan sebagai penilaian awal sebelum aspirasi sumsum tulang dilakukan. Pengambilan darah vena harus dilakukan bersamaan dengan aspirasi sumsum tulang dan evaluasi sediaan hapus darah tepi tetap dilakukan lagi sebagai bagian penilaian aspirasi sumsum tulang guna identifikasi sel-sel spesifik dan untuk mengkorelasikan selularitas sumsum tulang dengan sitopenia darah perifer. Apabila tidak dapat dilakukan bersamaan, pengambilan darah vena untuk pemeriksaan hematologi lengkap dan evaluasi darah tepi tidak lebih dari 24 jam.<sup>1,12</sup>

### **3.7 Selularitas Partikel dan Sel**

Sumsum tulang dibentuk oleh sel darah dan lemak yang terus berkembang. Jumlah sel di sumsum tulang relatif berubah diganti sel lemak seiring meningkatnya umur. Selularitas sumsum tulang dinilai sebagai ratio volume sel-sel hematopoitik terhadap volume total ruang sumsum tulang (sel-sel ditambah lemak dan elemen stromal lainnya). Membandingkan area yang diisi lemak dan sel sel berinti pada partikel atau densitas sel-sel berinti pada partikel ujung. Evaluasi selularitas partikel sumsum tulang dilakukan dengan menilai beberapa partikel pada sediaan hapus atau *preparat squash*. Selularitas lebih baik dinilai pada *preparat squash* dibanding sediaan hapus.<sup>11</sup>

Selularitas pada orang dewasa normal adalah 40-60% dan semakin berkurang pada orang tua. Rumus menentukan selularitas sumsum tulang:

$$\text{Selularitas SST (\%)} = 100 - \text{umur (tahun)}^8$$

Selularitas >60% dilaporkan sebagai hiperseluler, selularitas < 30-40% disebut hiposeluler. Selularitas dilaporkan sebagai aseluler, hiposeluler, normoseluler, hiperseluler atau sangat hiperseluler.<sup>6</sup>

### **3.8 Hitung Jenis Sel berinti**

Hitung jenis sel berinti sumsum tulang harus dilakukan untuk menentukan aktivitas hematopoitik dan untuk membandingkan proporsi masing-masing seri dibandingkan dengan nilai rujukan dan juga untuk menghitung sel-sel abnormal jika ada. Sel-sel sumsum tulang harus dihitung pada area sel terdistribusi baik

dengan detail sitologik yang jelas dan sel-sel lisis (*smudge*) sedikit. Hitung jenis sel berinti terdiri dari sel blast, promielosit, mielosit, metamielosit, netrofil batang, netrofil segmen, eosinofil, basofil, sel mast, promonosit dan monosit, limfosit, sel plasma dan eritroblast. Hitung jenis sel berinti tidak termasuk megakariosit, makrofag, osteoblas, osteoklas, sel stromal dan sel *smudge* atau sel-sel non hematopoitik seperti sel tumor metastatik. Jika ada agregat limfoid, tidak termasuk dalam hitung jenis sel berinti, tetapi dimasukkan dalam laporan.<sup>6</sup>

Penilaian kualitatif dan kuantitatif harus dilakukan untuk semua seri sel dan untuk setiap sel-sel abnormal yang terdeteksi. Jumlah berkurang, normal atau meningkat, apakah maturasi normal atau abnormal dan morfologi seri eritroid dan mieloid harus diterangkan jika abnormal. Jumlah sel blast harus dilaporkan. Jumlah limfosit dan sel plasma dan apakah morfologinya normal atau abnormal harus dicatat. Jumlah megakariosit dan morfologinya harus didokumentasikan. Jika makrofag jumlahnya meningkat, harus didokumentasikan dan jika ada kelainan morfologi harus dicatat misal hemo atau eritrofagositosis terdapat badan inklusi seperti mikroorganisme atau kristal, vakuola atau histiosit *sea-blue*.<sup>6</sup>

Peningkatan jumlah sel mast dan gambaran morfologi atipikal atau agregat harus dicatat. Setiap sel sel abnormal atau agregat sel tumor metastatik harus diterangkan dan terdapatnya sejumlah bermakna sel *smudge* harus didokumentasikan. Hasil pewarnaan besi dan hasil sitokimia lainnya harus dilaporkan.<sup>6</sup>

### **3.9 Jumlah Sel yang Dihitung**

Pemeriksaan sediaan hapus pertama kali dilakukan pada lapangan pandang kecil (obyektif 10x) untuk menilai jumlah fragmen, selularitas, jumlah megakariosit dan juga mendeteksi terdapatnya sel-sel abnormal seperti sel karsinoma. Lanjutkan dengan pembesaran obyektif 40x secara detail dan sistematis penilaian selularitas dan isi fragmen, jumlah megakariosit dan morfologi sel. Detail sitologik harus dinilai dengan lapangan pandang imersiobyektif 100x. Hitung jenis dilakukan pada beberapa fragmen area ujung yang merupakan area sediaan hapus yang paling minimal mengalami dilusi darah tepi.<sup>1</sup>

Penghitungan sel dilakukan minimal beberapa ratus sel seri granulosit, eritroid, limfosit dan sel plasma, tergantung indikasi aspirasi sumsum tulang. Jika indikasi aspirasi sumsum tulang adalah anemia defisiensi besi atau anemia megaloblastik, hitung jenis secara detail tidak diperlukan. Apabila indikasi aspirasi adalah

leukemia akut atau sindroma mielodisplasia, hitung jenis harus dilakukan pada 500 sel dan semua tipe sel harus dihitung dan penghitungan dilakukan pada beberapa sediaan hapus sumsum tulang yang berbeda.<sup>1</sup>

### **3.10 Ratio Mieloid dan Eritroid**

Ratio mieloid dan eritroid (Ratio M:E) dapat diperkirakan pada lapangan pandang kecil. Ratio normal adalah tiga sampai empat sel mieloid untuk setiap sel eritroid (ratio M:E antara 3:1 dan 4:1).<sup>9</sup>

### **3.11 Eritropoisis**

Penilaian selularitas, urutan maturasi, gambaran megaloblastik, abnormalitas sitologik, pulau-pulau eritroblastik dan lainnya.<sup>10</sup> Sel eritroid matang dari eritroblast ke normoblas-basofilik, polikromatofilik dan normoblas ortokromik. Sewaktu sel matang, inti berkondensasi dan sitoplasma secara bertahap menjadi pink karena hemoglobin.<sup>10</sup>

### **3.12 Mielopoisis**

Penilaian selularitas, urutan maturasi dan abnormalitas sitologik.<sup>7</sup> Mieloid secara normal matang dari mieloblast menjadi promielosit-mielosit-metamielosit- netrofil batang dan netrofil segmen.<sup>10</sup>

### **3.13 Megakariosit**

Penilaian jumlah, urutan maturasi, produksi trombosit dan *pleomorfisme*.<sup>10</sup>

### **3.14 Limfosit**

Penilaian agregat limfoid, pusat germinal, penilaian jumlah, satelitosis, malignansi.<sup>10</sup>

### **3.15 Sel Plasma**

Penilaian jumlah dalam persentase, maturasi, badan inklusi, satelitosis, perubahan neoplastik.<sup>10</sup>

### **3.16 Sel hematopoitik lain**

#### **Histiosit**

Penilaian jumlah, kandungan sitoplasma, aktivitas fagositik, lesi histiositik non neoplastik, histiositosis malignansi.<sup>10</sup>

### **3.17 Sel Abnormal (Sel Blast, Infiltrasi Metastatik)**

Terdapat kelompok-kelompok sel yang besar, sering pada bagian sisi atau ujung sediaan dengan batas seluler yang tidak jelas mungkin merupakan sel-sel kanker metastatik. Kelompok sel dapat berbentuk *amorphous* atau bentuk *rosette* seperti pada neuroblastoma metastatik. Kadang juga terlihat kelompok sel plasma malignan pada mieloma multiple atau kelompok osteoblast pada kasus jinak.<sup>9</sup>

### **3.18 Pewarnaan besi**

Pewarnaan besi sumsum tulang (pewarnaan *Prussian blue*) merupakan baku emas menentukan cadangan besi. Namun, pemeriksaan ini sering tidak dibutuhkan pada individu dengan riwayat klinis, sediaan hapus darah tepi dan analisis status besi sudah dapat ditegakkan diagnosis. Pewarnaan besi dapat juga digunakan untuk mengidentifikasi deposit besi abnormal pada prekursor eritroid misal cincin sideroblas pada sindroma mielodisplastik.<sup>9</sup>

### **3.19 Sitokimia**

Pewarnaan sitokimia sangat berguna dalam diagnosis dan klasifikasi leukemia akut. Dapat mengidentifikasi dengan baik leukemia akut mieloid dan limfoid dan menjadi dasar subklasifikasi leukemia mieloid akut berdasarkan kriteria *French-American-British* (FAB) dan *the World Health Organization classification* (WHO). Pewarnaan sitokimia *myeloperoxidase* (MPO) atau *Sudan black B* tetap menjadi petanda diagnosis leukemia mieloid akut (AML) pada sebagian besar kasus.<sup>13</sup>

### **3.20 Investigasi Lain Misal Sitogenetik, PCR, FISH, Mikrobiologi**

Laporan aspirasi sumsum tulang tidak boleh terlambat karena menunggu hasil investigasi tambahan dan hasil yang ditunda harus dicatatkan dalam laporan awal. Jika hasil analisis genetik molekular diketahui dan mempengaruhi diagnosis, harus dibuat komentar dalam laporan tambahan dan dilaporkan sewaktu hasil pemeriksaan ini atau investigasi tambahan lain tersedia. Laporan perbaikan diperlukan jika kesimpulan akhir dan diagnosis berubah akibat hasil tes tambahan ini. Jika sediaan hapus dinilai juga oleh orang lain, harus disampaikan dalam laporan dengan menyebutkan nama individu yang dikonsulkan atau laporan harus ditandatangani oleh keduanya.<sup>6</sup>

### **3.21 Kesimpulan Hasil Flow Cytometry (Jika Ada)**

Hasil pemeriksaan *flow-cytometri* yang relevan jika tersedia harus disimpulkan dalam laporan aspirasi sumsum tulang.<sup>6</sup>

### **3.22 Kesimpulan**

Laporan aspirasi sumsum tulang harus memuat kesimpulan yang tepat untuk menggambarkan opini dan jika diperlukan pemeriksaan anjuran lanjutan. Jika memungkinkan dapat membuat diagnosis definitif. Kesimpulan laporan aspirat sumsum tulang harus menuliskan diagnosis atau diagnosis banding yang sesuai dengan panduan konsensus internasional yang menjadi rujukan. Temuan utama disimpulkan dan investigasi lain sebagai catatan tambahan. Hasil harus dibandingkan dengan laporan aspirasi sumsum tulang sebelumnya jika pemeriksaan digunakan untuk monitor penyakit.<sup>1,6</sup>

Jika tidak ada partikel, megakariosit atau prekursor hematopoitik lain, sampel harus dilaporkan sebagai “*blood tap*” atau darah perifer. Jika partikel tidak ada, tetapi terdapat megakariosit atau sel prekursor lain, sampel harus dilaporkan sebagai sampel sumsum tulang yang terdilusi dan evaluasi kualitatif harus dilakukan. Terdapat partikel dengan selularitas yang sangat berkurang atau tidak ada, hanya deskripsi kualitatif yang harus dilakukan. Berbagai keadaan ketidakpastian dapat dituliskan sebagai contoh berikut: temuan sesuai dengan mieloma multipel atau diagnosis mieloma multipel terkonfirmasi; hasil aspirasi sumsum tulang mendukung diagnosis meloma multipel tetapi harus disesuaikan dengan temuan klinis, radiologi dan hasil laboratorium lain atau hasil aspirat sumsum tulang tidak mendukung kecurigaan mieloma multipel.<sup>1,6</sup>

### **3.23 Klasifikasi WHO Jika Relevan**

Diagnosis dan klasifikasi leukemia mieloid akut (AML) sangat berubah pada tahun 2022 dengan adanya klasifikasi neoplasma hematopoitik terbaru dari *World Health Organization* (WHO) edisi 5 dan *International Consensus Classification* (ICC) . Kedua sistem menggabungkan klinis, molekular/genetik, morfologik dan imunofenotipe untuk mengklasifikasikan AML dan memfasilitasi diagnosis yang tepat, prognosis, meningkatkan terapi dan uji klinis yang inovatif untuk AML. Leukemia mieloid akut dikelompokkan menjadi AML yang ditentukan dengan abnormalitas genetik dan AML yang ditentukan dengan diferensiasi.<sup>14</sup>

Proliferasi limfoid sel B dan limfoma dikelompokkan menjadi *Tumour-like lesions with B-cell predominance, Precursor B-cell neoplasms, B-cell lymphoblastic leukaemias/lymphomas, Mature B-cell neoplasms, Pre-neoplastic dan neoplastic small lymphocytic proliferations, Splenic B-cell lymphomas dan leukaemias, Lymphoplasmacytic lymphoma, Marginal zone lymphoma, Cutaneous follicle centre lymphoma, Mantle cell lymphoma, Transformations of indolent B- cell lymphomas, Large B-cell lymphomas, KSHV/HHV8-associated B-cell lymphoid proliferations and lymphomas, Lymphoid proliferations and lymphomas associated with immune deficiency and dysregulation, Hodgkin lymphoma, Plasmacell neoplasms* dan penyakit lain dengan paraprotein, *Monoclonal gammopathies, Diseases with monoclonal immunoglobulin deposition, Heavy chain diseases, Plasma cell neoplasms*.<sup>15</sup>

Proliferasi limfoid sel NK dan sel T dan limfoma dikelompokkan menjadi *Tumour-like lesions with T-cell predominance, Precursor T-cell neoplasms, T-lymphoblastic leukaemia/lymphoma, Mature T-cell and NK-cell neoplasms, Mature T-cell dan NK-cell leukaemias, Primary cutaneous T-cell lymphomas, Intestinal T-cell dan NK-cell lymphoid proliferations dan lymphomas, Hepatosplenic T-cell lymphoma, Anaplastic large cell lymphoma, Nodal T- follicular helper (TFH) cell lymphoma, Other peripheral T-cell lymphomas, EBV-positive NK/T-cell lymphomas, EBV-positive T- dan NK-cell lymphoid proliferations dan lymphomas of childhood*.<sup>15</sup>

### **3.24 Kode Penyakit**

Kode penyakit disesuaikan dengan terminology *Internasional Classification of disease* (ICD) yang menjadi panduan regulasi nasional di Indonesia.<sup>6</sup>

### **3.25 Tanda Tangan dan Tanggal Laporan**

Laporan harus ditandatangani secara manual atau elektronik dan diberi tanggal.<sup>6</sup>

## **IV. Turnaround Times (TAT)**

*Turnaround time* pemrosesan aspirasi sumsum tulang adalah waktu mulai dari pengambilan aspirat sumsum tulang sampai tersedianya slide aspirat sumsum tulang siap dibaca di bawah mikroskop adalah 2-6 jam, sementara TAT pelaporan adalah waktu mulai dari tersedianya slide untuk pemeriksaan mikroskopik hingga hasil pemeriksaan aspirasi sumsum tulang dilaporkan baik secara verbal maupun tertulis pada kasus urgen adalah 3 jam (verbal) dan 24 jam (tertulis), untuk bukan urgen adalah 48 jam (tertulis).<sup>16</sup>

## V. Kontrol Kualitas Eksternal

Partisipasi dalam kontrol kualitas eksternal (EQA) baik teknik dan interpretasi pemeriksaan aspirasi sumsum tulang menjamin dan direkomendasikan untuk memastikan akurasi, reproduibilitas dan standardisasi pemeriksaan aspirasi sumsum tulang.<sup>6</sup>

### Contoh laporan aspirasi sumsum tulang<sup>12</sup>

<b>Informasi pasien</b>				<b>Informasi dokter</b>			
Nama				Nama			
Gender				Nama RS			
Tanggal lahir/umur				Alamat			
MR				Kota/Provinsi			
Alamat				No telepon			
Final Diagnosis							
Tempat aspirasi/biopsi							
ACUTE MYELOID LEUKEMIA WITH t(8;21)(q22;q22.1); RUNX1-RUNX1T1, lihat komentar							
<b>Komentar</b>							
Sediaan hapus darah tepi: leukopenia, blas sedikit, mielosit, netrofil, limfositosis relatif, eritrosit normokromik, makrosit, anisositosis ringan, tear drop cell jarang, morfologi trombosit normal							
Aspirasi sst :Spikula sedikit, blast 65% dengan inti besar, kromatin halus dan auer rod positif, sitoplasma basofilik moderat dengan granul berwarna salmon. Prekursor mieloid matur sedikit, prekursor eritroid sangat berkurang, rubrisit binukleat jarang. Prekursor eosinophil sedikit, megakariosit dismorfik dengan peningkatan lobulasi nuklear							
Pewarnaan besi : pewarnaan besi pada makrofag, sideroblas dan cincin sideroblast jarang							
Flow Cytometri : Analisis sediaan hapus sst memperlihatkan populasi blas mieloid . Blas mengekspresikan CD34, CD15, HLA-DR, CD33, CD19 dan CD56. Tidak ada abnormalitas fenotipe pada limfosit							
<b>Hitung Jenis</b>							
Tanggal	DT	SST	Rujukan (%)		DT	SST	Rujukan (%)
Blast	4	65	0-2	Limfosit normal	50	2	3-24
Mieloblas			3-5	Limfosit reaktif			
Promielosit			1-8	Limfoblas			
Mielosit		14	5-21	Prolimfosit			
Metamielosit			6-22	Monosit	3		0-3
Netrofil batang			6-22	Sel plasma			0-2
Netrofil segmen	40	4	9-27	Rubriblas			0-4
Esinofil	3	7		Prorubrisit			1-6
Basofil				Rubrisit			5-25
Lainnya				Metarubrisit			1-21
Lainnya				Eritroid		8	10-30
Lekosit 2300	Ht 23	MPV 8	Hb 8,1	Trombosit 89.000			MCHC 110
<b>Sitogenetik</b> : ABNORMAL MALE KARYOTYPE: 45,XY,t(8;21)(q22;q22),-Y[20]							
Hasil sitogenetik ini sesuai dengan penyakit yang dikelompokkan sebagai AML dengan abnormalitas genetic berulang sesuai WHO 2016. Terdapat juga hilang kromosom Y yang merupakan temuan insidental dan tidak ada konsekuensi klinis pada pasien usia tua							
<b>Prognosis</b> : Prognosis baik untuk kemoterapi dan tingkat remisi komplrit							



## Daftar Pustaka

1. Bain BJ. Bone marrow aspiration. *J Clin Pathol* 2001;54:657–663
2. Riley R S, Gandi P, Harley SE, Garcia P, Dalton JB, Chesney A. A Synoptic Reporting System to Monitor Bone Marrow Aspirate and Biopsy Quality. *J Pathol Inform.* 2021; 12: 23
3. Palmer L, Briggs C, MCFadden S, Zini G, Burthem J, Rozenberg G et al. ICSH Recommendations for The Standardization of Nomenclature and Grading of Peripheral Blood Cell Morphological Features. *Int. Jnl. Lab. Hem.* 2015, 37, 287–303
4. Adewoyin AS, Nwogoh B. Peripheral Blood Film. A Review. *Ann Ibd. Pg. Med* 2014. Vol.12, No.2 71-79
5. Rosenthal DS. Evaluation of the Peripheral Blood Smear. Diakses dari <https://www.uptodate.com/contents/evaluation-of-the-peripheral-blood-smear>
6. Lee SH, Erber WN, Porwit A et al (2008) International Council for Standardization in Hematology. ICSH Guidelines for The Standardization of Bone Marrow Specimens and Reports. *Int J Lab Hematol* 30:349–364
7. Riley RS, Hogan TF, Pavot DR, Forysthe R, Masey D, Smith E et al. A Pathologist's Perspective on Bone Marrow Aspiration and Biopsy: I. Performing a Bone Marrow Examination. *Journal of Clinical Laboratory Analysis* 18:70–90 (2004)
8. Zehnder JL. 2023. Bone Marrow Aspiration and Biopsy : Indications and Technique. UpToDate. Diakses dari [https://www.uptodate.com/contents/bone-marrow-aspiration-and-biopsy-indication-and-technique?topicRef=4434&source=see\\_link](https://www.uptodate.com/contents/bone-marrow-aspiration-and-biopsy-indication-and-technique?topicRef=4434&source=see_link)
9. Rosenthal DS. 2023. Evaluation of Bone Marrow Aspirate Smears. UpToDate. Diakses dari <https://www.uptodate.com/contents/evaluation-of-bone-marrow-aspirate-smears>
10. Hyun BH, Gulati GL, Ashton JK. Bone Marrow Examination: Technique and Interpretation. *Hematology/Oncology Clinics of North America*-Vol. 2, No. 4, December 1988
11. McPherson RA, Pincus MR. HENRY's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods. Philadelphia. Elsevier Inc 2022. 24<sup>th</sup> Edition. Chapter 31: 540-586
12. Keohane EM, Otto CN, Walenga JM. Rodak's Hematology: Clinical Principles and Applications. Philadelphia. Elsevier Inc 2020. 6<sup>th</sup> Edition. Chapter
13. Barbara J. Bain. Leukemia Diagnosis. Acute Leukaemia Cytology, Cytochemistry and the FAB Classification Leukaemia Diagnosis. London; Blackwell Publishing Ltd 2010, Fourth Edition, Chapter 1: 1-59
14. Khoury JD, Solary E, Abla O, Akkari Y, Alaggio R, Apperly JF. The 5th Edition of The World Health Organization Classification of Haematolymphoid Tumours: Myeloid and Histiocytic/Dendritic Neoplasms. *Leukemia* 2022;36(7):1703-1719. doi:10.1038/s41375-022-01613-1
15. Alaggio R, Amador C, Anagnostopoulos I, Attygalle AD, Araujo IBDO, Berti E. The 5th Edition of The World Health Organization Classification of Haematolymphoid Tumours: Lymphoid Neoplasms. *Leukemia* (2022) 36:1720–1748; <https://doi.org/10.1038/s41375-022-01620-2>

16. Saeed M. Standardization of Bone Marrow Specimens Processing, Immunohistochemistry and Reporting. Diakses dari <https://www.slideshare.net/MuneerahSaeed/standardization-of-bone-marrow-specimen-processing-immunohistochemistry-and-reporting>

## **BAB 6**

### **PENUTUP**

Dalam buku Rumpun Patologi Klinik ini telah dibahas berbagai aspek ilmu patologi klinik seperti *Antiglobulin Test in Clinical Practice*, *PRP*, *Fibrin Glue*, and *PRF Treatment*, *Molecular Laboratory Set Up*, *Optimizing Digital Platform in Verification and Validation Laboratory Result*, serta *Evaluation Blood Smear and Bone Marrow Aspiration*.

Pada topik *Antiglobulin Test in Clinical Practice* dibicarakan tentang *Direk and Indirek Globulin Test* meliputi prinsip, cara kerja, hasil yang ditemukan pada beberapa kasus yang sering ditemukan dalam praktek sehari-hari, faktor yang mempengaruhi hasil, interpretasi hasil serta hal-hal yang menyebabkan interpretasi hasil tersebut.

Pada topik *PRP*, *Fibrin Glue*, and *PRF Treatment* dibicarakan tentang apa yang dimaksud dengan PRP, fibrin glue, PRF, kegunaannya pada klinis, serta prosedur pembuatan PRP, fibrin glue dan PRF.

Pada topik *Molecular Laboratory Set Up* dibicarakan tentang Manajemen bioresiko di laboratorium mulai dari penilaian resiko, pelaksanaan penanganan risiko, dan evaluasi pelaksanaan penanganan risiko. Juga dibicarakan tentang desain laboratorium molekuler meliputi persyaratan dan desain laboratorium molekuler. Serta juga dibicarakan *Next-Generation Sequencing* (NGS) meliputi perkembangan sequencing, tahap pemeriksaan NGS, aplikasi NGS pada klinis.

Pada topik *Optimizing Digital Platform in Verification and Validation Laboratory Result* dibicarakan tentang pemanfaatan platform digital pada pelayanan laboratorium terutama dalam hal verifikasi dan validasi hasil laboratorium. Selain itu juga dibicarakan *Logical Observation Identifiers Name and Codes* (LOINC) yang merupakan standar terminologi untuk permintaan dan hasil laboratorium. LOINC ini nantinya akan berintegrasi dengan platform SATUSEHAT yang diluncurkan oleh Kemenkes RI.

Pada topik *Evaluation Blood Smear and Bone Marrow Aspiration* dibicarakan, cara pelaporan sediaan apus darah tepi dan laporan aspirasi sumsum tulang.

Semoga buku Rumpun Patologi Klinik ini bisa menjadi bahan bacaan dan bermanfaat untuk pelayanan laboratorium di Indonesia ke depannya.

