

BAB II

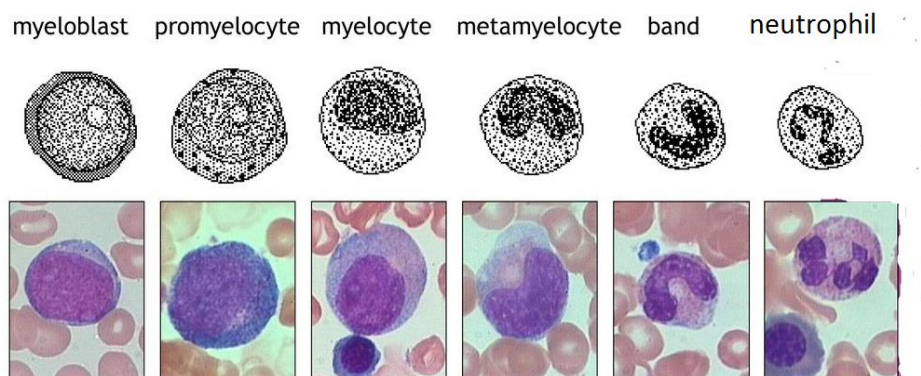
TINJAUAN PUSTAKA

A. Landasan Teori

1. Leukemia Myeloid Akut

a. Definisi

Leukemia myeloid akut merupakan proliferasi dari sel imatur pada sumsum tulang (*blast cell*) yang berakibat pada darah perifer atau organ lain. Persentase jumlah sel imatur untuk mendiagnosis leukemia akut adalah sebanyak 30% atau lebih. Walaupun, pada sistem panduan diagnosis terbaru dapat dijumpai sel imatur 20% atau kurang dalam mendiagnosis leukemia akut, dan tidak memerlukan batasan minimal ditemukannya sel imatur ketika ditemukan morfologi dan sitogenik tertentu (Hamid, 2018). Gambaran maturasi sel myeloid dapat dilihat di gambar di bawah ini.



Gambar 2.1. Maturasi Sel Myeloid

b. Epidemiologi

Leukemia merupakan keganasan darah yang berakibat pada sumsum tulang, darah perifer, jaringan limfonodi, dan organ lain (Yaswir *et al.*, 2017). Menurut data WHO pada tahun 2018, terdapat kasus baru leukemia sebanyak 437.033 kasus dari semua jenis kelamin dan tingkatan usia. Jumlah kematian akibat leukemia juga terbilang cukup tinggi di dunia yaitu sebanyak 309.006 kematian pada tahun 2018. Insiden terbanyak terdapat di benua Asia sebesar 212.702 kasus, Eropa 94.780 kasus, Amerika utara 56.876 kasus. Data WHO tahun 2018 menunjukkan kasus terbanyak adalah di Asia timur yaitu sebanyak 101.285 kasus baru dan 78.805 kasus kematian. Leukemia akut menempati urutan kelima keganasan tertinggi setelah kanker payudara, kanker leher rahim, kanker hati dan saluran empedu dan limfoma *non-Hodgkin*.

c. Etiologi

Malfungsi genetik yang tepat dalam sel induk hematopoietik yang mengakibatkan transformasi keganasan belum dipahami secara tepat, namun beberapa faktor risiko pada perkembangan leukemia akut telah teridentifikasi. Namun, sebagian besar pasien dengan leukemia akut tidak memenuhi salah satu dari kondisi berikut: (Hiddemann, 2016)

1) Paparan radiasi ionisasi

Radiasi ion dapat mengakibatkan mutasi DNA, penghapusan atau translokasi dengan menginduksi pemutusan rantai ganda dalam sel induk hematopoietik yang bergantung pada dosisnya. Efek leukemogenik dari radiasi ion sudah lama teridentifikasi, terutama karena peningkatan insiden AML (*Acute Myeloid Leukemia*) dan ALL (*Acute Lymphoblastic Leukemia*) pada penyintas bom atom dan ahli radiologi yang terpapar radiasi tingkat tinggi. Radiasi yang digunakan dalam pengobatan kanker juga bertanggung jawab pada pengembangan leukemia akut .

2) Paparan benzene

Paparan benzena diketahui dapat meningkatkan risiko perkembangan AML dan MDS (*Myelodysplastic Syndrome*) selama beberapa dekade. Bergantung pada dosisnya, tingkat benzena yang lebih rendah meningkatkan risiko MDS tetapi tidak untuk AML, tetapi tidak ada ambang batas yang pasti yang dianggap aman. Ada juga hubungan dengan pengembangan, dan di beberapa negara, leukemia akut yang diakibatkan karena paparan benzena selama bekerja dan diakui sebagai penyakit akibat kerja.

3) Gaya Hidup

Selain paparan bahan kimia, gaya hidup dapat mempengaruhi risiko perkembangan AML dan ALL. Meskipun mekanisme patofisiologis tidak diketahui, namun adanya kelebihan

berat badan dan juga merokok dapat meningkatkan risiko leukemia akut. Konsumsi alkohol bukan merupakan penyebab pasti terjadinya AML dan ALL pada orang dewasa, tetapi orang tua yang mengkonsumsi alkohol dapat meningkatkan risiko perkembangan leukemia masa anak-anak.

4) Kondisi genetik

Ada beberapa kelainan genetik yang memiliki manifestasi sistemik yang dominan tetapi juga terkait dengan perkembangan leukemia akut seperti *Down Syndrome* dan sindrom *Li Fraumeni*. Selain itu, sindrom kegagalan sumsum tulang yang diwariskan seperti *Fanconi* anemia dan sindrom *Shwachman-Diamond* menimbulkan kecenderungan untuk pengembangan neoplasia myeloid dan leukemia akut.

d. Patogenesis

Patogenesis utama Leukemia myeloid akut adalah adanya *blokade* maturitas yang menyebabkan proses diferensiasi sel-sel seri mieloid terhenti pada sel-sel muda (*blast*) dengan akibat terjadi akumulasi blast di sumsum tulang. Akumulasi *blast* dalam sumsum tulang akan menyebabkan gangguan hematopoiesis normal dan pada gilirannya akan mengakibatkan sindroma kegagalan sumsum tulang (*bone marrow failure syndrome*) yang ditandai dengan adanya sitopenia (anemia dan trombositopenia). Anemia dapat menyebabkan

pasien mudah lelah dan pada kasus yang lebih berat bisa terjadi sesak nafas, trombositopenia yang menyebabkan tanda-tanda perdarahan, leukopenia yang menyebabkan pasien akan rentan terhadap infeksi, termasuk infeksi oportunistik dari flora bakteri normal yang ada di dalam tubuh manusia. Selain itu sel-sel blast yang terbentuk juga memiliki kemampuan untuk migrasi keluar sumsum tulang dan berinfiltrasi ke organ-organ lain seperti kulit, tulang, jaringan lunak dan sistem saraf pusat dan merusak organ-organ tersebut dengan segala akibatnya (Arber *et al.*, 2016).

e. Klasifikasi

Klasifikasi leukemia myeloid akut yang biasa digunakan adalah berdasarkan kriteria *French-American-British* (FAB) dan WHO. Menurut kriteria FAB, sel *blast* sumsum tulang untuk penegakan diagnosis leukemia sebesar $\geq 30\%$. Diagnosis leukemia myeloid akut berdasarkan morfologi menurut WHO dapat dilakukan dengan menghitung setidaknya 200 leukosit pada apusan darah tepi dan 500 sel berinti pada apusan sumsum tulang. Jumlah *blast* yang ditemukan dalam sumsum tulang minimal sebesar 20%. Myeloblast, monoblast, dan megakaryoblast termasuk dalam hitungan blast. AML dengan diferensiasi monosit atau mielomonositik, monoblas dan promonosit dihitung sebagai *blast* (Dohner *et al.*, 2017).

Klasifikasi berdasarkan FAB membagi *Acute Myeloid Leukemia* (AML) dalam 8 sub tipe (AML M0 – AML M7) dan *Acute Lymphoblastic Leukemia* (ALL)). Secara spesifik M0 menunjukkan AML dengan diferensiasi morfologi atau sitokimia minimal, M1-2 dengan diferensiasi granulositik minimal atau sedang, M3 *Acute Promyelocytic Leukemia* (APL), M4 AML dengan campuran diferensiasi mielomonositik, M5a dan M5b adalah leukemia monoblastik dengan diferensiasi minimal atau sedang, M6a adalah leukemia mieloid dengan latar belakang eritropoiesis displastik, M6b leukemia akut eritroblastik, dan M7 adalah leukemia akut megaloblastik (Hamid, 2018).

f. Diagnosis

Pendekatan diagnostik pada leukemia akut telah terjadi perubahan yang signifikan selama 20-30 tahun terakhir. Kemajuan diagnosis mencerminkan pemahaman tentang perubahan genetik dan molekuler yang berkontribusi pada leukemogenesis. Secara garis besar diagnosis kerja leukemia myeloid akut yaitu berdasarkan pemeriksaan sumsum tulang pada pasien yang dicurigai berdasarkan klinis dan laboratorium, pemeriksaan morfologi, sitokimia *immunophenotyping* dan *immature granulocyte*. Setelah itu dapat dilakukan pemeriksaan lanjutan berupa pemeriksaan sitogenetik, molekuler, namun membutuhkan waktu yang agak lama, tetapi hasil yang diperoleh dapat

digunakan untuk klasifikasi dan diagnosis definitif penyakit. (Dohnell, 2017)

Menurut Dohnell (2017), pendekatan diagnosa untuk leukemia myeloid akut, dapat menggunakan pemeriksaan sebagai berikut :

1) Pemeriksaan morfologi

Aspirasi sumsum tulang merupakan bagian dari pemeriksaan rutin untuk diagnosis leukemia myeloid akut. Pulasan darah dan sumsum tulang diperiksa dengan pengecatan *May-Grunwald-Giemsa* atau *Wright-Giemsa*. Untuk hasil yang akurat, diperlukan setidaknya 500 sel *Nucleated* dari sumsum tulang dan 200 sel darah putih dari perifer.

2) *Immunophenotyping*

Pemeriksaan ini menggunakan *flowcytometry*, sering untuk menentukan tipe sel leukemia berdasarkan antigen permukaan. Pemeriksaan *Immunophenotyping* sangat penting untuk mendiagnosis leukemia myeloid akut, terutama untuk memastikan jenis leukmeia dengan dengan diferensiasi minimal.

3) *Immature granulocyte*

Immatur granulocyte dalam darah bisa dikaitkan dengan gangguan hematologi. Penghitung sel darah otomatis dapat melakukan berbagai fungsi dari hitung darah lengkap

hingga hitung diferensial leukosit hampir dapat menggantikan penilaian manual tradisional untuk skrining awal dan mendeteksi kelainan hematologi.

2. *Immature Granulocyte*

Immature granulocyte (IG) yang ada dalam darah perifer memberikan informasi penting yang menunjukkan peningkatan aktivitas sumsum tulang. Fraksi *Immature granulocyte* termasuk *Promyelocytes*, *Myelocytes* dan *Metamyelocytes* (Maenhout, 2014).

Immature granulocyte dalam darah perifer menunjukkan leukopoiesis dan merupakan indikator paling awal dari stimulasi sumsum tulang disebabkan oleh infeksi, peradangan, atau rangsangan lainnya. Pemanfaatan leukosit perifer sebagai tanggapan adanya rangsangan, sumsum tulang menghasilkan lebih banyak leukosit, dan terjadi pergeseran kiri (*left shift*) dalam garis keturunan leukosit. Sel-sel imatur yang dimaksud yaitu *metamyelocytes*, *promyelocytes*, dan *myelocytes*. Selama beberapa dekade, *Immature granulocyte* digunakan untuk mengidentifikasi infeksi (Prabu, 2020).

Perhitungan IG dapat dilakukan secara mikroskopis dengan membuat apusan darah maupun dengan cara otomatis menggunakan alat. Perhitungan IG secara otomatis lebih menguntungkan karena dapat menghitung jumlah sel lebih banyak dan juga dapat menghindari bias yang disebabkan interpretasi operator. Perhitungan persentase IG diperoleh

dengan menggunakan rumus : partikel IG yang terhitung pada *scatter gram* dibagi partikel yang terhitung pada zona leukosit pada *scatter gram* kemudian dikalikan 100 (Jeon *et al.*, 2021).

Kemajuan terbaru dalam otomatisasi hematology analyser secara signifikan mempersingkat waktu tunggu hasil untuk pelaporan hitung jumlah dan hitung jenis leukosit dalam darah perifer. Karakterisasi dan kuantifikasi sel darah otomatis yang handal tetap menantang dalam sampel patologis, sehingga apusan darah tepi tidak perlu dilakukan karena adanya *flagging*. Fitur penting dari penghitung sel hematologi otomatis adalah kemampuannya untuk mengidentifikasi dan menghitung *Immature granulocytes* (IG) dalam sampel darah perifer (Nierhaus, 2013).

Hematology Analyser seri paling baru diperkenalkan dan kinerjanya dievaluasi. *Hematology Analyser* memberikan kemungkinan untuk secara otomatis menghitung *Immature granulocytes* (IG) dalam darah perifer. Setelah menerapkan agen *lysing* spesifik (*Lysercell WDF*), IG diukur dalam saluran WDF dan diferensiasi dibuat berdasarkan granularitas (*side scatter*) dan kandungan asam nukleat (*side fluorescence* oleh reagen *Fluorocell WDF*). Gugus IG ditemukan tepat di atas gugus neutrofil dalam *side scatter* pada fluoresensi histogram biparametrik (Nierhaus, 2013).

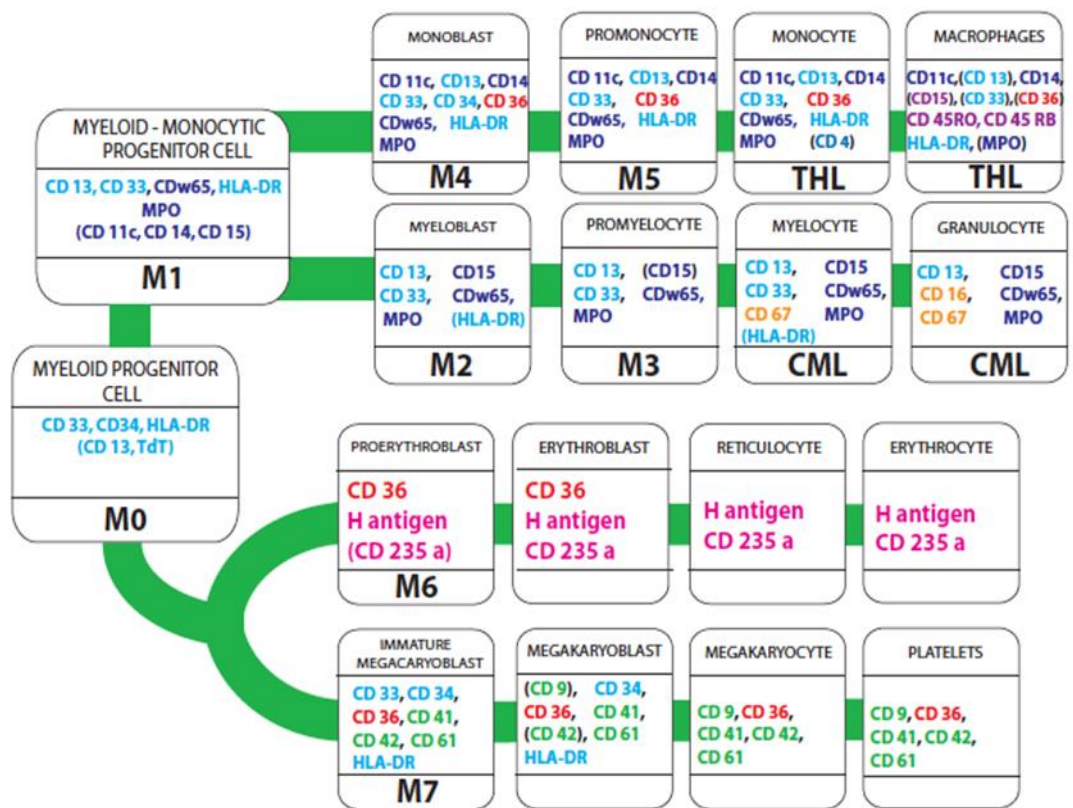
Rekomendasi untuk *Hematology Analyser* adalah untuk meninjau kembali sampel dengan hitung jenis leukosit dengan *Immature Granulocyte* di atas 3% dengan pemeriksaan mikroskop manual untuk mencapai akurasi yang lebih tinggi. Penelitian Parvinen menunjukkan

bahwa *Immature Granulocyte* 5% untuk *Hematology Analyser* merupakan batas yang cukup akurat, bukan 3% (Parvinen, 2021).

3. *Immunophenotyping*

Immunophenotyping telah menjadi alat diagnostik yang penting dan sensitif dalam menetapkan diagnosis dan klasifikasi leukemia akut. Alat ini memiliki implikasi diagnostik, prognostik, dan terapeutik yang baik. Kemampuannya untuk mengukur berbagai penanda pada sel-sel dengan kecepatan tinggi sangat ideal untuk mempelajari sel-sel leukemia. Penanda yang digunakan dalam analisis *Immunophenotyping* adalah sebagai berikut: CD2, CD4, CD5, CD7, CD9, CD10, CD19 (*lymphoid lineage*), CD13, CD15, CD33, CD34, CD41, CD65, CD11c (*myeloid lineage*), cyCD3, CD11b, CD13c, CD14, cyCD22, cyMPO, TdT, CD4, CD5, CD38, CD56, cyCD79a, CD117, HLA-DR (*non-specific lineage*).

Eksresi setiap penanda ditandai dengan persentase sel yang mengekspresikan penanda ini dengan tingkat fluoresensi yang melebihi ambang batas *background* yang ditentukan dengan kontrol isotipe (Plesa *et al*, 2018). Diferensiasi sel myeloid dan penanda sel yang terlibat dapat dilihat pada gambar 2.2.



Gambar 2.2. Diferensiasi sel myeloid dan penanda sel yang terlibat (Plesa *et al.*, 2018)

Jenis leukemia sangat penting diketahui untuk menentukan terapi. *Immunophenotyping* dapat membantu untuk memberikan petunjuk dengan menggunakan beberapa penanda (*marker*) dalam penegakan diagnosis dan jenis leukemia. Penanda yang digunakan untuk diagnostik leukemia myeloid akut dapat dilihat pada tabel 2.1. *European Group for Immunological Classification of Acute Leukemias* memberikan sistem scoring untuk beberapa penanda sehingga dapat ditentukan jenis leukemia (Manelli, 2016).

Tabel 2.1. *European Group for Immunological Classification of Acute Leukemias* (Manelli, 2016)

Score	Myeloid	B Lymphoid	T Lymphoid
2	cyPMO	CD22, cyCD79a, cyIgM	cyCD3, TCR
1	CD13, CD33, CD117, CD65	CD19, CD10, CD20	CD2, CD5, CD8, CD10
0.5	CD14, CD15, CD64	CD24, TdT	TdT, CD7, CD1a

CD34 adalah fosfoglikoprotein transmembran yang pertama kali diidentifikasi pada sel induk dan sel progenitor hematopoietik. CD34 memiliki berat molekul sekitar 115 kDa. Ligan yang paling umum dijelaskan untuk CD34 adalah L-Selectin. CD34 dalam sumsum tulang atau sampel darah menunjukkan campuran antara sel induk dan sel progenitor hematopoietik. Namun, sebagian besar sel tersebut adalah sel induk hematopoietik. Sel induk hematopoietik dapat dibedakan dari sel-sel progenitor dengan adanya rendahnya ekspresi CD90, serta tidak adanya ekspresi CD38, *human leukocyte antigen-DR*, dan sebuah panel penanda garis keturunan hematopoietik yang matang. Sel induk hematopoietik mampu berdiferensiasi menjadi semua sel dari garis turunan hematopoietik dan memiliki kapasitas proliferasi tinggi (Sidney, 2014).

BD OneFlow™ ALOT (*Acute Leukemia Orientation Tube*) ditujukan untuk *Flowcytometric Immunophenotyping* pada populasi sel hematopoietik immatur yang aberrant (*lineage limfoid* dan *non-limfoid*) pada sumsum tulang dan darah tepi untuk membantu mendiagnosis

leukemia limfoblastik akut dan leukemia akut non-limfoid. BD OneFlow™ ALOT terdiri dari dua tabung sekali pakai yang berisi antibodi yang berikatan dengan *fluorochrome* dalam formula kering yang optimal. Tabung BD OneFlow™ ALOT (S) mengandung antibodi yang mengenali penanda pada permukaan sel, sedangkan tabung BD OneFlow™ ALOT (C) berisi antibodi yang mengenali antigen pada sitoplasma sel setelah berikatan dan permeabilitas sel tersebut. (BD Oneflow User Guide). Alat BD Facs Canto II dan Reagen BD OneFlow™ A LOT dapat dilihat pada gambar berikut.



Gambar 2.3. BD Facs Canto II dan Reagen BD OneFlow™ A LOT

Antibodi pada BD OneFlow ALOT dipilih karena kemampuannya untuk mengidentifikasi dan menentukan karakter populasi sel darah yang imatur *aberrant* (BD Oneflow User Guide).

- a. CD45, CD34, dan CD19 adalah penanda *backbone* untuk panel BCP-ALL.
- b. CD45, *cytoplasmic* CD3 (cyCD3), dan CD3 adalah penanda *backbone* untuk panel T-ALL.

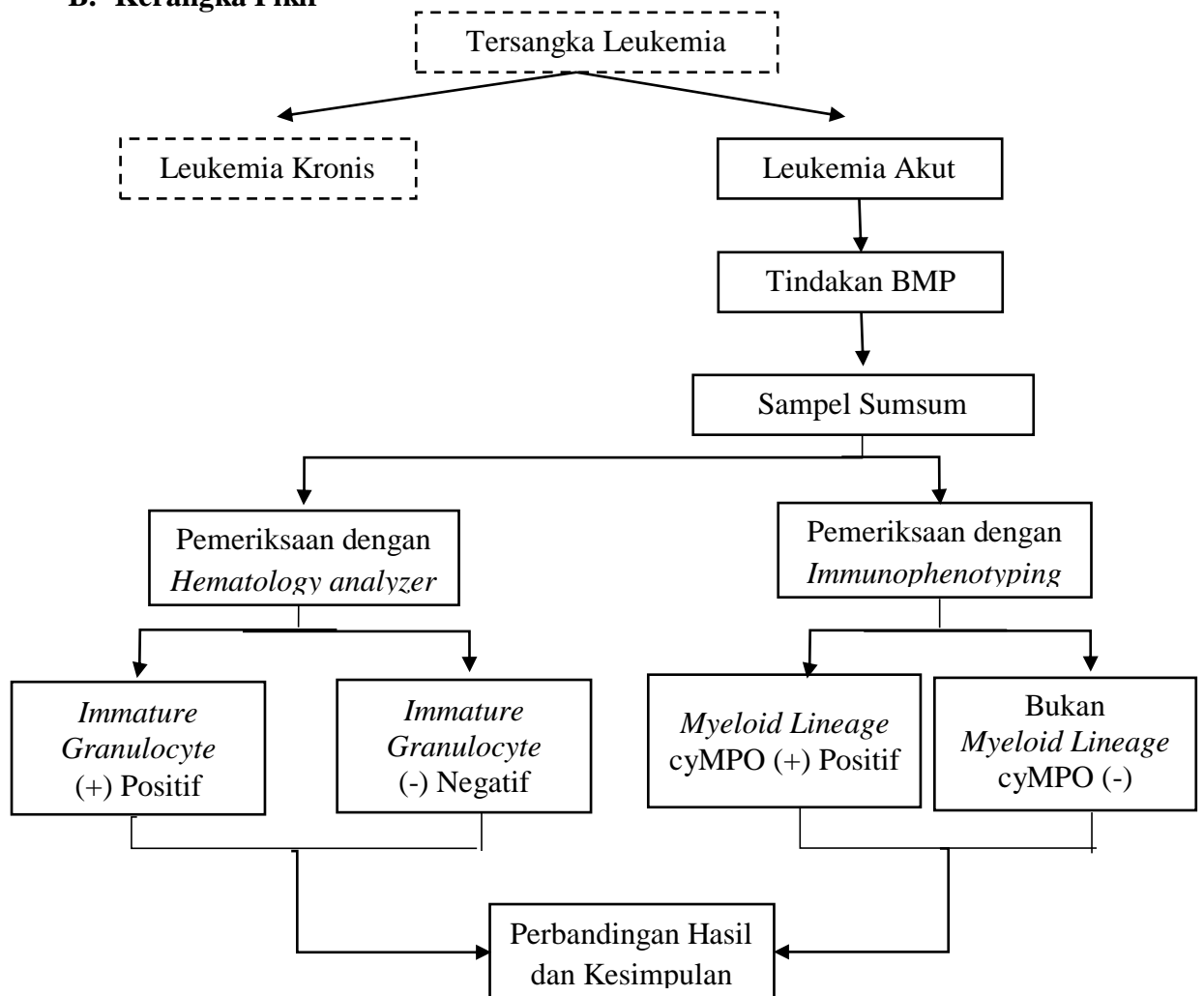
- c. CD45 dan CD34 adalah penanda *backbone* untuk panel AML.
- d. CD34 dan ekspresi negatif atau dim CD45 (CD45 neg/dim) adalah penanda untuk sel imatur.
- e. *Cytoplasmic myeloperoxidase* (cyMPO) merupakan penanda *lineage* mieloid.
- f. cyCD3 dan CD7 adalah penanda *lineage* sel T.
- g. CD3 digunakan sebagai penanda maturitas sel T.
- h. CD19 dan *cytoplasmic* CD79 (cyCD79) adalah penanda *lineage* sel B.

Immature Granulocyte dan *Immunophenotyping* mempunyai beberapa perbedaan mulai dari apa yang dapat dideteksi, kemudian alat yang digunakan untuk pemeriksaan, waktu yang dibutuhkan untuk mengerjakannya, harga per test nya sampai spesifisitas nya. Perbedaan *Immature Granulocyte* dan *Immunophenotyping* ditunjukkan pada tabel berikut:

Tabel 2.2. Perbedaan *Immature Granulocyte* dan *Immunophenotyping*

	Terdeteksi	Alat	Waktu pengerjaan	Harga	Spesifisitas
Immature Granulocyte	Promielosit, Mielosit dan Metamielosit	Sysmex XN-1000	1 menit	Lebih mahal	Kurang spesifik
Immuno phenotyping	Ekspresi CD marker pada sel leukosit	BD Facs Canto II	2 jam	Lebih murah	Lebih spesifik

B. Kerangka Pikir



Gambar 2.4. Kerangka pikir

Keterangan :



Variabel penelitian



Variabel lain yang tidak diteliti

C. Hipotesis

Immature granulocyte memiliki performa uji diagnostik yang baik terhadap pemeriksaan *immunophenotyping* pada leukemia *myeloid* akut.