

616.994  
HAR  
k e1

466 Jilid BSR = 12 Bulet



**KESESUAIAN DIAGNOSIS MORFOLOGI PENGECATAN  
ROMANOWSKY, SITOKIMIA, DAN IMUNOSITOKIMIA TERHADAP  
PENGECATAN KONVENSIONAL PADA LEUKEMI AKUT**

**SUNARTO HARIMAN**

**LABORATORIUM PATOLOGI KLINIK  
FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS DIPONEGORO**

**1998**

Karya ilmiah akhir ini telah disetujui untuk dipertahankan dihadapan Tim Penguji  
PPDS I Patologi Klinik FK. UNDIP

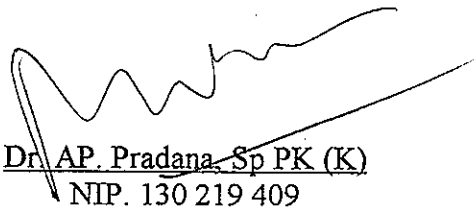
Telah disetujui

Pembimbing II



Dr. Latiyani Djamil, Sp PK (K)  
NIP. 140 086 930

Pembimbing I



Dr. AP. Pradana, Sp PK (K)  
NIP. 130 219 409

Ketua PPDS I  
Patologi Klinik FK. UNDIP



Dr. Lisyani Suromo, Sp PK (K)  
NIP. 130 354 869

## Ringkasan .

Pengecatan konvensional pada hapus darah tepi dan sumsum tulang yang dilakukan di RSUP Dr. Kariadi yaitu Giemsa & Sudan Black B ( SBB ) masih menimbulkan banyak keraguan. Guna mendapat diagnosis yang lebih akurat sebagai salah satu cara yang bermanfaat didalam keberhasilan terapi serta pertimbangan bahwa pengecatan sitokimia dan imunositokimia tidak memerlukan peralatan yang mahal dan canggih dan masih jarang nya penelitian mengenai pengecatan kombinasi Romanowsky, sitokimia dan imunositokimia di Indonesia , maka dilakukan penelitian mengenai mengenai hal tersebut secara deskriptif analitik dengan pendekatan belah lintang terhadap penderita yang klinis dan pemeriksaan darah rutin dicurigai leukemia akut secara consecutive sampling dari bulan Maret sampai September 1997 terhadap semua usia baik pria maupun wanita yang belum mendapat terapi sitostatika. Dari 17 penderita ( 5 LNLA, 10 LLA, 2 CML dalam krisis blastik ) rawat inap di bagian Anak dan Penyakit Dalam RSUP Dr. Kariadi, RS. Telogorejo dan RS Elisabeth dengan menggunakan pengecatan Giemsa dan Mieloperoksidase ( MPO ), Naphthol AS-D Chloroacetate ( CLE ),  $\alpha$  - Naphthyl Butyrate Esterase ( BUE ) dan imunositokimia Terminal Deoxynucleotidyl Transferase ( TdT.) dengan hasil sebagai berikut :

\* 5 penderita dengan pengecatan konvensional menunjukkan LNLA ternyata setelah penelitian :

- 2 M4 tetap M4
- 1 M5 berubah menjadi M4
- 1 M2 tetap M2
- 1 M5 merupakan Acute undifferentiated leukemia

10 penderita dengan pengecatan konvensional menunjukkan LLA ternyata setelah penelitian menunjukkan 9 LLA , kecuali 1 sebagai LNLA.

2 penderita dengan pengecatan konvensional menunjukkan CML dengan krisis blastik, setelah penelitian hasilnya menunjukkan CML krisis blastik predominan limfoblast.

Analisa statistik derajat kesesuaian ( Kappa ) dengan tes Mc Nemar menyatakan pengecatan MPO, CLE, BUE, TdT dapat digunakan menentukan subtype LNLA dibandingkan Giemsa dan SBB ( PABAK=0,80 dan BAK =0,80 ) walaupun masih ada yang tidak terdeferensiasi dengan pengecatan MPO, CLE, BUE, TdT ( 1 dari 17 penderita = 5,8 % ) . Pengecatan Giemsa & SBB sangat baik menentukan leukemia akut termasuk LNLA atau LLA (PABAK = 0,87, BAK = 0,86) . Pengecatan MPO, CLE, BUE, TdT sebaiknya dilakukan secara rutin untuk menentukan diagnosis lebih akurat karena pengecatan Giemsa & SBB saja tidak cukup untuk menentukan subtype LNLA.

## SUMMARY

Conventional stainings on peripheral blood smears and bone marrow smears in Dr. Kariadi General Hospital : Giemsa & Sudan Black B ( SBB ) makes many confusions in confirming which serial group cells are, to get a more accurate diagnosis as a tool to bring a better outcome of therapy furthermore cytochemical and immunocytochemical stainings do not need expensive and too sophisticated metode and apparatus, there are only a few study for combined Romanowsky, cytochemical and immunocytochemical stainings in Indonesia. Descriptive analitical study with cross sectional approach and consecutive sampling from March until september 1997 to all age , men and women , to whom cytostatic had not been given , from 17 hospitalized patients in Dr. Kariadi General Hospital, Telogorejo Hospital and Elisabeth Hospital with Giemsa and Mieloperoxidase ( MPO ), Naphthol AS-D Chloroacetate ( CLE ) ,  $\alpha$  - Naphthyl Butyrate Esterase ( BUE ) , immunocytochemical staining : Terminal Deoxynucleotidyl Transferase ( TdT ).

5 patient with conventional stainings are described as ANLL :

- 2 patients are suspected M4, and combined staining confirms they are the same type.
- 1 patient is suspected M5 but after combined staining they are M4

- 1 patient is suspected M2 and the result with combined staining is the same.
- 1 patient is suspected M5 but after combined staining it is confirmed as acute undifferentiated leukemia.

10 patient with conventional stainings are described as ALL after study they confirm 9 are described as ALL and 1 is described as ANLL.

2 patients with conventional stainings are described as CML in blastic crisis. But after our study they are CML in blastic crisis with limfoblastic predominant.

After Kappa for degree of agreement with Mc Nemar test MPO, CLE, BUE, TdT should be used to confirm LNLA subtypes compare to Giemsa & SBB ( PABAK =0,80 and BAK =0,80 ) although there is still Acute Undifferentiated Leukemia ( 1 in 17 patients = 5,8 % ). Giemsa & SBB are good to confirm acute leukemia as ANLL or ALL but not good enough to confirm ANLL subtypes accurately.

Cytochemical and imunocytochemical are need to be done routinely in getting an accurate diagnostic. Conventional stainings alone are not enough to confirm ANLL subtypes.

## **RIWAYAT HIDUP**

**Nama** : Sunarto Hariman

**Alamat** : Jl. Bukit Duta No 16 A (Villa Bukit Mas) Semarang

**Tempat/Tanggal lahir** : Cirebon, 18 Nopember 1959

**Agama** : Katolik

**Nama Orang Tua** : Djonni Irwanto Dan Farah

**Status Perkawinan** : Kawin

**Nama Isteri** : Muljati

**Nama Anak** : Ignatius Aldrich Hariman

**Pangkat/Golongan** : Penata Muda /III A

**Jabatan** : Dokter Pratama

**NIP** : 140 243 988

**Riwayat Pendidikan** : Lulus SD di Cirebon 1972  
Lulus SMP di Cirebon 1975  
Lulus SMA di Bandung 1979  
Lulus FK. UNPAD di Bandung 1986

## KATA PENGANTAR

Segala puji syukur kami sampaikan ke hadirat Allah Bapa yang maha Rahim, yang karena segala kasih Karunia Nya kepada kami sekeluarga, maka penulis dapat menyelesaikan karya ilmiah akhir sebagai salah satu syarat memenuhi pendidikan Program Pendidikan Spesialis I Patologi Klinik Universitas Diponegoro Semarang.

Pada Kesempatan yang berbahagia ini penulis menyampaikan terima kasih dan penghargaan setinggi-tingginya kepada almarhum dr. Bambang Sutrisno JS, Sp PK(K) yang telah membimbing penulis dalam membuat usulan penelitian, hal mana tetap dilakukan dengan sabar dan penuh kasih walaupun jasmani beliau makin melemah karena sakit yang diderita.

Kepada Dr. AP Pradana, Sp PK(K) sebagai pembimbing I yang memberi bimbingan, memberikan fasilitas dan sarana tanpa mengenal waktu.

Kami haturkan terima kasih kepada Dr. Latiyani Djamil, Sp. PK (K) sebagai pembimbing II.

Kepada Dr. Lisyani Suromo, Sp PK(K) sebagai Ketua program studi Patologi Klinik atas semua saran, kritik dan perkenannya sehingga penelitian ini dapat terselesaikan,



Terima kasih kami haturkan kepada Dr. C. Suharti, Sp.PD (KH) yang telah memberi motivasi penulis meneliti dan bimbingan baik moril maupun teori serta pembacaan sediaan-sediaan.

Ucapan terima kasih disampaikan pula kepada Dr. Sabardiman Sp.PK(K) yang memberikan dorongan moril.

Ucapan terima kasih disampaikan pula kepada Dr. Affandi Ichsan SpPK(K) atas bimbingannya selama ini.

Kami haturkan terima kasih kepada Dr. Purwanto AP, Sp.PK selaku Kepala Bagian Patologi Klinik atas bimbingannya.

Terima kasih kepada Dr. Tjahjati Djokomoeljanto, Sp.PK atas bimbingannya.

Terima kasih kepada Dr. Imam Budiwiyono SpPK atas segala bimbingannya selama ini.

Terima kasih kepada Dr. Banundari Rachmawati, SpPK atas bimbingannya.

Penghargaan juga disampaikan kepada Prof. DR. AG. Soemantri Sp A(K) dan Prof. DR. Ign. Sudigbya Sp A(K) yang telah memberi perkenan, bimbingan serta motivasi penulis untuk mengambil sample penderita di Bagian Anak RSUP Dr. Kariadi Semarang.

Terima kasih kepada Dr. Sotianingsih yang membantu alih bahasa.

Tak Bisa dilupakan ucapan terima kasih kepada Drg. Henry Setiawan dari FKM yang telah banyak memberi bimbingan dan bantuan dalam metodologi penelitian.

Terima kasih penulis haturkan kepada Lince Winarsih dari Laboratorium Patologi Klinik serta Maya, Wiwi, Endah, Haryati, Siti, Endang, Susetyo, Susi, Yanti, Aneke dari Laboratorium Telogorejo.

Ucapan terima kasih kepada segenap tim penguji

Akhirnya kepada isteriku tercinta, anakku Aldrich, kepada kedua mertuaku serta paman dan bibi di Bandung kami haturkan penghargaan setinggi-tingginya atas kasih sayang, pengorbanan, pengertian dan doa sehingga penulis dapat menyelesaikan pendidikan dan karya Ilmiah ini.

Semarang, Juni 1998



## DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL .....	i
HALAMAN PENGESAHAN .....	ii
RINGKASAN .....	iii
SUMMARY .....	v
RIWAYAT HIDUP .....	vii
KATA PENGANTAR .....	viii
DAFTAR ISI .....	xi
DAFTAR TABEL .....	xiv
DAFTAR GAMBAR .....	xv
BAB I : .....	1
A. Latar belakang penelitian .....	1
B. Masalah penelitian .....	3
C. Tujuan penelitian .....	3
D. Manfaat penelitian .....	3
BAB II : TINJAUAN PUSTAKA .....	4
A. Leukemi Akut .....	4
1. Sejarah .....	4
2. Definisi .....	5
3. Klasifikasi.....	6
4. Gambaran klinis.....	10
5. Gambaran laboratorik.....	13
a. Pemeriksaan darah tepi.....	13
b. Gambaran blas pada leukemi akut.....	15
c. Pemeriksaan sumsum tulang .....	18
d. Gambaran karakteristik dari leukemi akut .....	19
B. Macam macam pemeriksaan untuk menunjang diagnosis leukemi	
Akut.....	25
1. Pengecatan Romanowsky.....	25

2. Pengecatan sitokimia.....	28
2.1 Sudan Black B.....	30
2.2 Mieloperoksidase.....	30
2.3 Esterase.....	31
2.4 Pengecatan sitokimia pada sel darah normal .....	35
2.5 Cara membedakan LNLA dengan LLA.....	36
2.6 Imunositokimia.....	43
“ Cell Markers “ .....	43
TdT .....	44
Metoda APAAP .....	45
Prosedur Diagnostik Penderita Leukemi Akut .....	48
Pendekatan Diagnostik .....	49
Strategi Penelitian .....	50
BAB III: METODE PENELITIAN .....	51
A. Ruang lingkup.....	51
B. Rancangan Penelitian .....	51
C. Sampel dan populasi.....	51
D. Bahan penelitian.....	52
E. Alat atau instrumen untuk pengumpulan data.....	52
F. Cara pemeriksaan.....	52
a. Pemeriksaan laboratorium penunjang.....	52
b. Pemeriksaan sitokimia.....	53
G. Prosedur pengambilan dan pengumpulan data .....	64
H. Cara atau teknik analisa data .....	65

BAB IV HASIL PENELITIAN .....	66
A. Karakteristik Penderita .....	66
B. Penderita dengan curiga LNLA .....	66
C. Penderita curiga CML Krisis Blastik .....	68
D. Penderita curiga LLA .....	70
BAB V DISKUSI/PEMBAHASAN .....	74
BAB VI KESIMPULAN DAN SARAN .....	<b>77</b>
DAFTAR PUSTAKA .....	<b>78</b>
DAFTAR LAMPIRAN .....	
Hasil Analisa Statistik .....	
Daftar Foto .....	

## DAFTAR TABEL

Tabel 1. Klasifikasi FAB LLA.....	8
Tabel 2. Hasil pengecatan sitokimia pada sel sel darah .....	35
Tabel 3. Karakteristik sel sel pada LNLA dengan LLA.....	36
Tabel 4. Hasil pengecatan sitokimia pada leukemia akut .....	37
Tabel 5. Gambaran morfologi & sitokimia pada LNLA.....	38
Tabel 6. Gambaran hematologi dan sumsum tulang sebelum pengecatan MPO, CLE, BUE, TdT.....	72
Tabel 7. Hasil penelitian.....	73

## DAFTAR GAMBAR

Gambar 1. Cara membedakan Lekemi Akut dan Sindroma Mielodisplasia .....	17
Gambar 2. Skematik Diagram APAAP .....	45
Gambar 3. Prosedur Inkubasi APAAP .....	46



## BAB I

### A. LATAR BELAKANG

Leukemia merupakan suatu penyakit neoplasia dari sistem pembentukan sel-sel darah dengan tanda-tanda proliferasi abnormal pada sel-sel darah yang sukar atau tidak dapat dikendalikan lagi. Proliferasi sel leukemik tersebut dapat masuk ke dalam sirkulasi darah dan menginfiltrasi organ tubuh lain sehingga mengakibatkan gangguan metabolisme sel dan fungsi organ (Latiyani-Djamil,1995)

Ketepatan menentukan leukemia termasuk seri mielositik, limfositik atau "undifferentiated" kemudian menentukan leukemia akut atau kronik akan menentukan keberhasilan terapi. Sebagai langkah awal di Bagian Patologi Klinik RSUP Dr. Kariadi dilakukan pengecatan Giemsa dan Sudan Black B ( SBB ) pada hapusan darah tepi dan sumsum tulang sebagai pemeriksaan konvensional , tetapi dengan pengecatan tersebut sering ditemui kesulitan didalam menentukan seri sel, maka perlu dilakukan pengecatan sitokimia lain , imunositokimia bahkan bila perlu dilakukan pemeriksaan petanda imunologik, sitogenetik, biokimiawi dan kultur. (Bain

AS-D Chloroacetate ( CLE ) untuk melihat komponen granulopoetik (Catovsky, 1995)

dan  $\alpha$  - Naphthyl Butyrate Esterase ( BUE ) untuk melihat komponen monositik

( Catovsky, 1995 ). Bila mana hasil pengecatan MPO ternyata negatif maka dilanjutkan dengan pemeriksaan Terminal Deoxynucleotidyl Transferase ( TdT ) untuk mengetahui adanya proliferasi sel T imatur.

Dengan melakukan kombinasi pengecatan Giemsa , MPO, CLE, BUE dan TdT diharapkan akan diperoleh gambaran konfirmasi morfologi yang lebih baik.

Sampai saat ini di Indonesia masih sedikit penelitian mengenai hasil pengecatan tersebut diatas pada leukemia akut yang diperlukan untuk konfirmasi morfologi sehingga membuat diagnosis lebih akurat.

## B. MASALAH PENELITIAN

Sejauh mana konfirmasi diagnosis hasil-hasil pengecatan kombinasi Giemsa dan

- pengecatan sitokimia :

a. Mieloperoksidase ( MPO )

b. Naphthol AS-D Chloroacetate ( CLE )

c.  $\alpha$  - Naphthyl Butyrate Esterase ( BUE )

- pengecatan imunositokimia

-Terminal Deoxynucleotidyl Transferase (TdT)

terhadap hasil pengecatan Giemsa dan Sudan Black B (SBB)

## C. TUJUAN PENELITIAN

Mengetahui nilai kesesuaian hasil konfirmasi diagnosis morfologis sediaan hapus sumsum tulang yang dicat kombinasi Giemsa dengan MPO, CLE, BUE, TdT terhadap Giemsa & SBB

## D. MANFAAT PENELITIAN

Dengan didapatkannya metoda penentuan morfologis yang lebih tepat dalam menentukan tipe leukemia akut maka diharapkan didapat diagnosis yang lebih akurat sebagai salah satu cara yang bermanfaat didalam keberhasilan terapi.

## BAB II

### TINJAUAN PUSTAKA

#### A. Leukemia Akut.

##### 1. Sejarah

Istilah leukemia akut pertama kali dikemukakan oleh Craigie dan Bennett pada tahun 1845. (Sullivan AK,1993, Latiyani-Djamil,1990) Virchow juga mengemukakan hal yang serupa pada tahun 1847. (Sullivan AK,1993, Latiyani-Djamil,1990)

Bentuk leukemia akut pertama kali dilaporkan pada tahun 1857 oleh Friederich, sedangkan gejala-gejala yang menyertainya pertama kali dipublikasikan oleh Ebstein pada tahun 1899 (Sullivan AK,1993 ; Latiyani-Djamil,1990)

Metoda pengecatan sel-sel darah pertama kali yang diperkenalkan oleh Ehrlich mengungkapkan hubungan bentuk-bentuk sel-sel darah tertentu dengan gejala klinis yang khas. (Sullivan AK,1993). Diikuti oleh Naegeli yang menemukan mieloblas dan Reshad dan Schilling-torgau pada 1913 yang melaporkan bentuk leukemia monositik (Sullivan AK,1993)

Pada awalnya cukup menentukan keganasan seri limfositik atau bukan, karena terapi yang tersedia hanya untuk seri limfositik dan non limfositik (Lukens J, 1993). Kini terapi tiap subtype seri limfositik maupun mieloid berbeda, sehingga penentuan subtype setiap seri menjadi semakin penting (Lukens J, 1993)

Pada tahun 1976 para peneliti dari Perancis, Amerika, dan Inggris melakukan klasifikasi yang seragam untuk leukemia akut, dikenal sebagai klasifikasi FAB . Sistem ini berdasarkan morfologi sel sumsum tulang dan darah tepi dengan pengecatan Romanowsky, dilengkapi dengan pengecatan sitokimia (Lukens J,1993)

## 2. Definisi.

Leukemia akut merupakan keganasan sekelompok sel darah heterogen yang mengenai stem sel , dimana masing masing jenis mempunyai perbedaan (Lukens J,1993).

- asal stem selnya
- gejala klinik
- perjalanan penyakit
- respon terhadap terapi.

Serta proliferasi abnormal dan akumulasi sel hematopoietik (sel lekemik) yang dapat menyebabkan kegagalan sumsum tulang (Wirawan R, Kosasih A, Setiabudi R, 1993)

Proliferasi sel lekemik tersebut dapat masuk ke dalam sirkulasi darah dan menginfiltrasi organ tubuh sehingga mengakibatkan gangguan metabolisme sel dan fungsi organ (Wirawan R, Kosasih A, Setiabudi R, 1993)

### 3. Klasifikasi :

Secara morfologis dan pengecatan sitokimia FAB membagi leukemia akut menjadi :

#### a. Leukemia non limfositik akut :

- M0 : AML tanpa maturasi : Mieloblas tanpa granule
- M1 : AML dengan maturasi minimal : Mieloblas dengan atau tanpa granule yang jelas.
- M2 : AML dengan maturasi : Mieloblas dengan granule , promielosit, beberapa mielosit.
- M3 : Akut promielositik leukemia : Promielosit dengan granule yang jelas
- M3v : Promielositik hipogranuler
- M4 : Akut Mielomonositik leukemia : Mieloblas dan promielosit > 20 % sel sumsum tulang . Promonoblas monoblas > 20 % .

M4 eosinofil

M4 basofil

- M5 : M5a : Akut monoblastik leukemia tanpa deferensiasi : Monoblas besar dengan kromatin inti tersusun serupa serat benang pada kain , sitoplasma yang banyak.

- \_ M5b : Akut monoblastik leukemia dengan diferensiasi : Monoblas, promonosit, monosit, monositosis darah.
- \_ M6 : Akut eritroleukemi : Megaloblastik eritroid precursor ( > 50 % ); Mieloblas > 30 %.
- \_ M7 : Leukemia megakariositik : Megakarioblas, morfologi limfoid ( L1, L2, M1 ), Budding pada sitoplasma.

b. Leukemia limfositik akut.:

LLA berdasarkan klasifikasi FAB dibagi atas :

- L1 : ukuran sel kecil, reguler ,anak inti tidak jelas , sitoplasma tipis.
- L2 : ukuran besar, ireguler, anak inti prominen, sitoplasma cukup luas.
- L3 : ukuran besar, reguler atau bulat, anak inti prominen, sitoplasma cukup luas.

( Lihat tabel 1 dibawah ini )

Tabel 1 : KLASIFIKASI FAB : LEUKEMI LIMFOSITIK AKUT

Gambaran morfologis	L1	L2	L3
. Ukuran sel	Kecil	Besar	Besar
. Kromatin inti	"Fine atau Clumped"	"Fine"	"Fine"
. Bentuk inti	Reguler bisa ada cleft atau indentasi	Irreguler bisa ada cleft atau indentasi	Reguler oval atau bulat.
. Anak inti	Tidak jelas bahkan tidak tampak	Satu atau lebih besar, prominen	Satu atau lebih, besar, prominen
. Sitoplasma	"Scanty"	"Moderatly abundant"	"Moderatly abundant"
Basofilia pada sitoplasma	"Slight"	"Slight"	"Prominen"
Vakuol pada Sitoplasma	"Variabel"	"Variabel"	"Prominen"

( Sumber : Lukens J 1993)

### KLASIFIKASI IMUNOTIPIK LLA

\* " Early Pre-B ALL " : (Lukens, 1993 )

Bentuk paling primitif LLA ini tidak memiliki Immunoglobulin permukaan, immunoglobulin sitoplasma dan rantai berat sitoplasma ( $\mu$ ). Memiliki petanda sel B dini : CD 19, CD 24, CD 34. Terjadi pada 70 % kasus anak anak dan sekitar 50 % kasus dewasa . 90 % anak dengan LLA " early pre B " mengekspresi

CD 10 ( CALLA ), subtipe ini dijuluki " common ALL ".



Prognosa lebih baik pada yang mengekspresi CD 10 dan CD 34 . Secara karakteristik terdapat peningkatan aktifitas TdT dan 5' - nucleotidase.

\* "Pre B Cell ALL " :

Blas LLA pre B memiliki rantai berat sitoplasma , tidak memiliki rantai ringan atau imunoglobulin permukaan. 90 % atau lebih memiliki CD 10 ( CALLA + ) dan kebanyakan termasuk klasifikasi FAB L1 ( Leukemi Limfositik Akut ). Sebagai mana "early pre B" ditandai TdT yang positif dan mengekspresi Ia/ HLA-DR, CD 19, CD 20 dan CD 24.

\* "B Cell ALL " :

Merupakan 1-2 % penderita LLA, Sel blas mengekspresi imunoglobulin permukaan , umumnya IgM . Seringnya memiliki CD 10 , Ia/ HLA-DR, CD 19, CD 20 dan CD 24. Tipe ini terdapat pada 75 % FAB L3 ( Leukemi Limfositik Akut ) dan mempunyai kemiripan dengan Limfoma Burkitt. Perjalanan klinis yang agresif ternyata sesuai dengan fase leukemi dari Limfoma Burkitt

• " T Cell ALL " :

Sel T matur mempunyai petanda permukaan CD 4 dan CD 8 yang penting untuk membedakan sel T helper , T delayed typed helper sensitivity dengan sel T sitotoksik , T penekan.

Sel T matur dapat membentuk Roset dengan eritrosit domba karena adanya CD 2 , tetapi pada " T cell ALL " pada 1/3 kasus tidak dapat membentuk Roset dengan eritrosit domba. Untuk mendeteksinya perlu diperiksa CD 7, CD 5 dan CD 2.

CD 3 sitoplasma sangat spesifik untuk sel T LLA, sedangkan CD 3 permukaan jelek responsnya terhadap terapi karena dapat berdeferensiasi multi seri. Bila didapat CD1 atau CD 55 diduga merupakan derivat Natural Killer. Berbeda dari LLA sel B pada LLA sel T klasifikasi subtype hanya mempunyai makna klinis terbatas. Sebagian besar keganasan sel T yang berhubungan dengan stadia prothymocyte secara klinik merupakan leukemia akut sedangkan yang berasal dari stadia maturasi yang lebih matang merupakan limfoma atau leukemia.

4. Gambaran klinis : (Mc. Glave PB, 1980)

a. Tanda dan gejala non spesifik :

- lelah
- lemah badan
- Penurunan berat badan
- Nafsu makan menurun

b. Akibat proses infiltrasi : LLA dan LNLA subtype M4 dan M5 terjadi infiltrasi pada sumsum tulang, kelenjar getah bening, organ dalam perut, jaringan lunak dan kulit dapat menimbulkan gejala nyeri tulang, pegal-pegal, perut terasa penuh, hiperplasi gingiva, perdarahan dan masa tumor

c. Penyebaran ke susunan syaraf pusat : terjadi pada LLA dewasa dan LNLA tipe M4 dan M5 berupa :

- nyeri kepala
- mual

- pandangan kabur

Penyebaran pada syaraf kranial dapat diduga bilamana pemeriksaan jasmani didapat : edema papil, kelumpuhan syaraf atau tanda-tanda meningitis.

“Chloroma” yang terdapat pada LNLA dapat menyebabkan kompresi syaraf spinal yang harus segera diketahui untuk mendapat penanganan yang memadai guna mencegah gangguan yang permanen. Pada LLA walaupun jarang dapat terjadi gangguan metabolik seperti “hiperphagia” dan kegemukan.

Kadar glukosa rendah dan protein tinggi pada LCS harus dicurigai penyebaran ke susunan syaraf pusat.

- d. Infeksi : dapat terjadi pada keadaan neutrofil yang secara kuantitatif jumlahnya rendah ( $< 500/dL$ ) atau pada keadaan fungsi neutrofil yang jelek dapat terjadi sepsis, sinusitis, infeksi saluran nafas, infeksi saluran kemih, rektum dan susunan syaraf pusat. Pemeriksaan “Rectal toucher” harus dilakukan dengan sangat hati-hati pada penderita leukemia untuk mencegah trauma, hematoma maupun terjadinya abses. Untuk mengevaluasi infeksi dilakukan foto thorax dan sinus, kultur bakteri, virus maupun jamur terhadap cairan otak, darah, faeces dan hapusan oropharynx. (Mc Glave, 1988)
- e. Defisiensi pembekuan : yang terjadi karena trombositopenia akibat supresi megakariosit atau penggunaannya serta abnormalitas fungsi trombosit mengakibatkan gangguan pembekuan berupa :

- Epistaksis

- Ekimosis dan Purpura
- Perdarahan mukosa dan ginggiva
- Hematuria
- Melena
- Perdarahan retina
- Perdarahan otak
- DIC

“Coagulopathy” : diakibatkan pelepasan zat akibat hasil lisis sel lemak pada masa pengobatan. DIC paling sering terjadi pada LNLA tipe M3, diikuti M4 dan M5 serta jarang pada subtipe yang lain. Infeksi sistemik dan defisiensi faktor pembekuan sering menyebabkan koagulapati. Koagulapati akan memperburuk keadaan trombositopeni.

Untuk mengetahui defisiensi faktor pembekuan dilakukan pemeriksaan jumlah trombosit dimana didapat trombositopeni, “prothrombin time”, partial thromboplastin time “memanjang. Peningkatan “Fibrin degradation product”, kadar fibrinogen rendah ; Trombositopeni, “thrombin time” memanjang, penurunan faktor 5 dan 7 dicurigai tanda awal DIC. Pada DIC yang telah lanjut didapat “partial thromboplastin time” dan “prothrombin time” memanjang. DIC tidak harus disertai kelainan morfologi eritrosit.

## 5. Gambaran laboratorik :

### a. Pemeriksaan darah tepi:

Kelainan sel sel darah tepi pada leukemia akut dapat memberikan gambaran sebagai berikut (Djulbrgovic B, 1992) .

- Kelainan kuantitatif sel darah putih, yang biasanya kita jumpai jumlah leukosit merupakan salah satu dibawah ini :
  - leukositosis
  - leukopeni
  - normal
- Kelainan kualitatif sel darah putih

Kelainan kualitatif sel darah putih disini meliputi tanda tanda keganasan secara umum ( AP Pradana, 1995 )

#### a. Ciri selnya :

- ukurannya abnormal
- memberikan gambaran yang monoton ( clonal morphology ) dimana sel sel abnormal tampak serupa
- kecenderungan untuk bergeombol/ berkelompok

#### b. Ciri sitoplasmanya :

- mudah rusak/pecah/rapuh ( fragmentasi )
- hipogranulasi

- adanya granula yang tidak lazim ( batang Auer, inklusi SUPRAS dan halo )
- granula campuran eosinofilik-basofilik

c. Ciri intinya :

- ukurannya besar
- multipel
- bercelah ( clefting )
- berlekuku-lekuk ( convuluted )
- adanya excrescences
- ratio inti sitoplasma besar
- meningkatnya gambaran mitotik
- hiposegmentasi ( pseudo Pelger Huet ) atau kadang kadang hipersegmentasi
- megaloblastoid ( tidak memberikan respon terhadap pemberian vitamin B12 / asam folat )
- nukleoli tampak lebih prominen

**b. Gambaran blas pada leukemia akut**

Blas :

Definisi :

Menurut FAB ada 2 macam sel blas LNLA yaitu blas tipe I dan blas tipe II.

Blas tipe I granula azurofil tidak ada, kromatin inti halus, anak inti jelas dapat satu atau lebih, ratio inti sitoplasma tinggi.

Blas tipe II mengandung granula azurofil dalam jumlah sedikit, bentuk seperti blas tipe I tetapi rasio inti sitoplasma rendah dan letak inti di tengah.

Menurut FAB, diagnosis leukemia akut dapat ditegakkan bila pada hitung jenis minimal 500 sel sumsum tulang didapatkan :

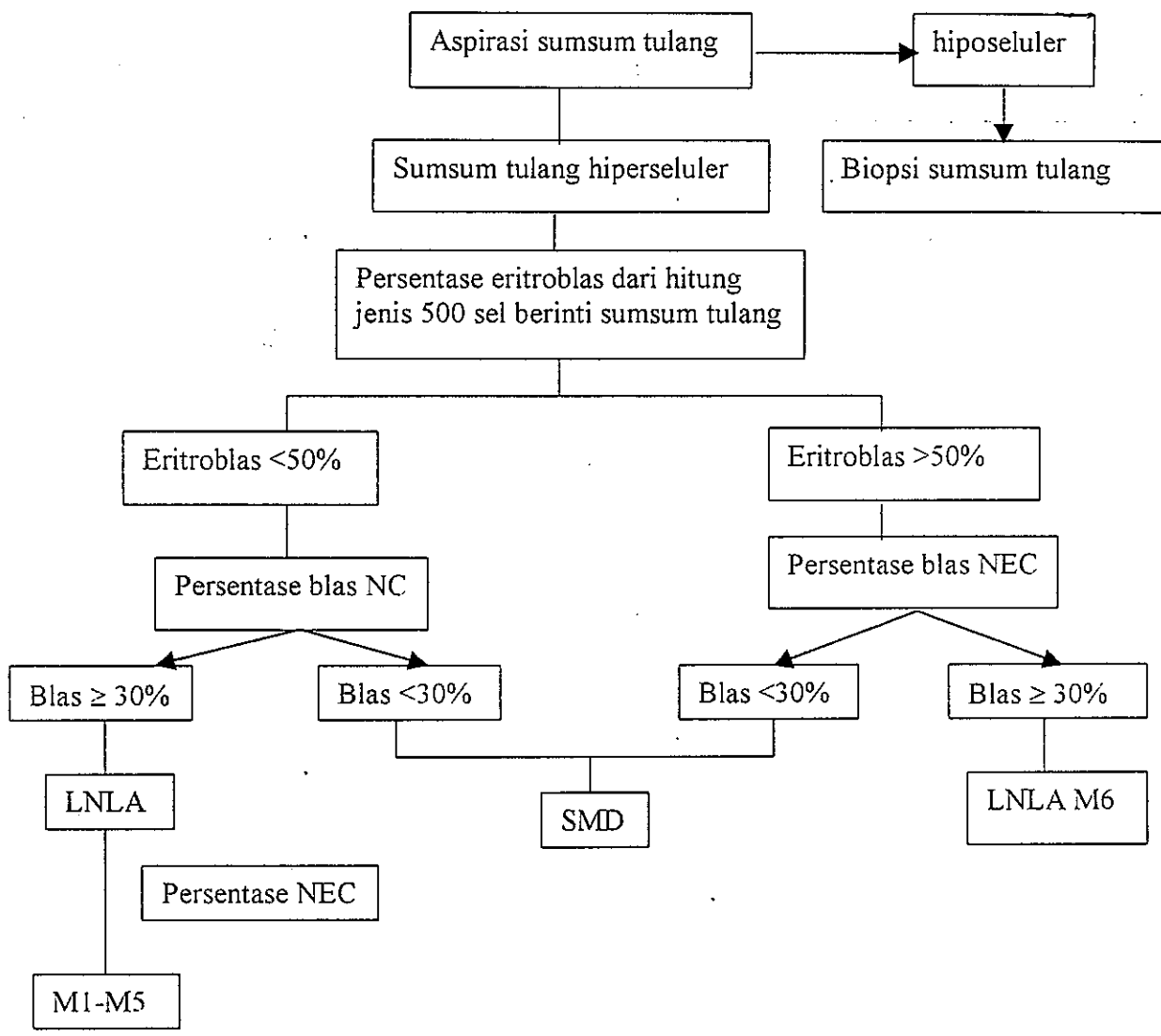
1. Sel blas tipe I dan tipe II  $>30\%$  dari semua sel berinti ("nucleated cell" atau NC)
2. Bila seri eritroid dominan, yaitu  $>50\%$  dari semua sel berinti (NC) dan disertai blas tipe I dan tipe II  $>30\%$  dari sel non eritroid ("non eritroid cell" = NEC). Sel-sel yang tidak termasuk NEC dalam sumsum tulang adalah limfosit, sel plasma, sel mast dan makrofag.
3. Gambaran morfologik sesuai dengan leukemia promielositik hipergranuler.

Bila pada hitung jenis 500 sel berinti (NC) dalam sumsum tulang didapatkan persentase eritroblas (rubriblas sampai metarubrisit) kurang dari 50% dan didapatkan sel blas tipe I dan tipe II  $>30\%$  maka diagnosis adalah LNLA

UPT-POSTAL-UNDIP

yang dapat berupa tipe M1, M2, M3, M4, M5. Penentuan tipe M1 sampai M5 didapatkan dari perhitungan persentase hitung jenis sel non eritroid (NEC) pada sediaan hapus sumsum tulang. Bila persentase eritroblas dari semua sel berinti (NC) dalam sumsum tulang kurang dari 50% dan sel blas tipe I dan tipe II kurang dari 30% maka diagnosisanya adalah sindroma mielodisplasi ( SMD . Bila pada hitung jenis 500 sel berinti (NC) sumsum tulang didapatkan eritroblas lebih dari 50% dan persentase sel blas dari sel non eritroid (NEC) lebih besar dari 30% maka diagnosanya adalah LNLA tipe M6. Bila jumlah sel blas dari NEC kurang dari 30% dimasukkan dalam diagnosa SMD.





Keterangan : NC : semua sel berinti dalam sumsum tulang. NEC : sel non eritroid kecuali limfosit, sel plasma, sel Mast, makrofag. SMD : sindroma Mielodisplasia

Gambar 1 : Cara untuk membedakan lekemi akut dengan sindroma Mielodisplasia ( Sumber : Mazza J. 1998)

c. Pemeriksaan sumsum tulang :

Terdiri dari : - aspirasi

- biopsi

Aspirasi :

Dengan pengecatan Giemsa dan sitokimia terhadap sediaan hapus sumsum tulang maka dapat ditentukan LLA maupun LNLA serta subtipeya masing masing <sup>(Mc Glave PB, 1988)</sup>.

Sumsum tulang yang diberi antikoagulan heparin dapat dipergunakan untuk analisa sitogenetik mendeteksi hiperdiploid dan translokasi yang berguna bagi kepentingan diagnosis maupun prognosis <sup>(Mc Glave PB, 1988)</sup>. Penentuan fenotipe dengan menggunakan antibodi monoklonal pada sumsum tulang yang belum diterapi dapat digunakan bagi keberhasilan terapi lekemi dengan cara transplantasi sumsum tulang yang dilakukan oleh beberapa "centre" <sup>(Mc Glave PB, 1988)</sup>.

Biopsi

Biopsi hanya dilakukan bila diperlukan informasi tambahan selain aspirasi sumsum tulang , atau adanya kegagalan aspirasi.

- Indikasi biopsi sumsum tulang meliputi :

- Gagal mendapat cukup bahan dari aspirasi
- Evaluasi dari bi atau pansitopeni
- Setiap kecurigaan akan adanya mielofibrosis

- Patchy Anemia aplastik
- Kecurigaan metastase pada sumsum tulang limfoma maupun proses granulomatosa sumsum tulang
- Menentukan aplasi pada suatu lekemi mieloid akut

d. Gambaran karakteristik dari leukemi akut :

Gambaran darah tepi dan sumsum tulang leukemi akut sangat bervariasi . Pada beberapa keadaan akan tampak gambaran yang spesifik , tetapi tidak jarang merupakan gambaran sel sel yang sangat tidak spesifik dan kadang kadang gambaran sediaan hapus darah tepi dan sumsum tulang sinkron, tetapi tidak jarang sangat berlainan. Untuk itulah kami memberikan gambaran yang karakteristik untuk masing masing jenis leukemi akut.

Lekemi mielositik akut dengan diferensiasi minimal (MO)

(Wirawan R, Kosasih A, Setiabudi R, 1993) :

- Blas > 30 % sel berinti sumsum tulang
- Blas positif dengan SBB dan MPO <3% dengan menggunakan mikroskop cahaya
- Blas merupakan mieloblas yang dibuktikan dengan petanda imunologik atau pewarnaan sitokimia ultrastruktur

- Menunjukkan aktivitas MPO dengan cara sitokimia mempergunakan antibodi monoklonal
- Menunjukkan antibodi monoklonal yang spesifik untuk mieloid yaitu CD 13 dan CD 33

#### Leukemi mielositik akut tanpa maturasi (M1)

(Wirawan R, Kosasih A, Setiabudi R, 1993)

- Blas tipe I dan II  $\geq 90\%$  sel non eritroid sumsum tulang dimana  $\geq 3\%$  dari sel blas tersebut bereaksi positif dengan SBB atau MPO
- Komponen granulositik matur dalam sumsum tulang (promielosit sampai segmen)  $\leq 10\%$  dari sel non eritroid.
- Komponen monositik matur dalam sumsum tulang (promielosit sampai monosit)  $< 10\%$  dari sel non eritroid.

#### Leukemi mielositik akut dengan maturasi (M2)

(Wirawan R, Kosasih A, Setiabudi R, 1993)

- Blas tipe I - II terdapat 30 - 89 % sel non eritroid sumsum tulang.
- Komponen granulositik matur dalam sumsum tulang (promielosit sampai segmen)  $> 10\%$  dari sel non eritroid.

- Komponen monositik dalam sumsum tulang (monoblas sampai monosit) < 20% dari sel non eritroid dan kriteria M4 tidak ditemukan.

#### Leukemi Promielositik akut hipergranuler (M3)

- Sel dominan adalah promielosit abnormal yaitu :
  - bentuk inti melekuk; (bilobed), bentuk ginjal
  - hipergranulasi, multipel Auer Rod
- DIC

#### Leukemi promielositik akut hipogranuler - M3v :

Kriteria sama dengan M3 dan ditambah dengan

- Promielosit abnormal yaitu :
  - hipogranulasi/agranuler
  - inklusi sitoplasma oval/elips

#### Leukemi Mielomonositik akut -M4

- Blas tipe I dan II  $\geq$  30% sel non eritroid sumsum tulang
- Komponen granulosistik sumsum tulang (mieoblas sampai lekosit PMN)  $\geq$  20% dari sel non eritroid.

- Bila komponen monositik menunjukkan satu dari kriteria dibawah ini
  - Komponen monositik sumsum tulang (monoblas sampai monosit)  $\geq 20\%$  dari sel non eritroid dan jumlah komponen monositik pada darah perifer  $\geq 5 \times 10^9/l$ .
  - Komponen monistik sumsum tulang (monoblas sampai monosit)  $\geq 20\%$  dari sel non eritroid dan dikonfirmasi dengan pewarnaan sitokimia atau peningkatan konsentrasi lisosim serum/urin.
  - Sumsum tulang mirip M2 tetapi komponen monosit darah perifer  $> 5 \times 10^9/l$  dan konfirmasi dengan pewarnaan sitokimia atau peningkatan konsentrasi lisosim serum /urin.

#### Leukemi monositik akut - M5

- Blas tipe I - II  $>30$  sel non eritroid.
- Komponen monositik sumsum tulang  $\geq 80\%$  sel non eritroid.

Lekemi monoblastik akut M5a : Monoblas  $> 80\%$  komponen monositik sumsum tulang.

Lekemi monositik akut M5b : Monoblas  $< 80\%$  komponen monositik sumsum tulang.

### Eritroleukemi - M6

- Eritroblas  $\geq$  50% sel berinti (NC) sumsum tulang
- Blas tipe I - II  $>$  30% sel non eritroid sumsum tulang

### Leukemi megakariositik akut ( M7 )

- Blas  $>$  30% sel berinti (NC) sumsum tulang.
- Blas merupakan megakarioblas yang dibuktikan dengan petanda imunologis, morfologik ultra struktur atau pewarnaan sitokimia ultra struktur.

### LLA tipe L1

Ukuran limfoblas pada umumnya kecil, bentuk homogen, sitoplasma sedikit dengan rasio inti sitoplasma tinggi. Sitoplasma berwarna biru muda sampai sedang, kadang-kadang terdapat vakuolisasi yang bervariasi. Bentuk inti biasanya teratur, bulat dan kadang-kadang terdapat sedikit lekukan, kromatin halus dan homogen. Anak inti kecil dan tidak jelas <sup>(Wirawan R, Kosasih A, Setiabudi R, 1993 ; Niemeyer CM, Sallan SE, 1993)</sup>

### LLA tipe L2

Ukuran limfoblas lebih besar dari L1, bentuk heterogen, rasio inti sitoplasma bervariasi. Sitoplasma bervariasi, pada umumnya luas dengan warna dan vakuolisasi yang bervariasi. Bentuk inti tidak teratur, sering terdapat lekukan atau celah, kromatin inti heterogen, bervariasi dari halus sampai padat. Anak inti biasanya tampak jelas, besar dapat satu atau lebih (Wirawan R, Kosasih A, Setiabudi R, 1993 ; Niemeyer CM, Sallan SE, 1993)

### LLA tipe L3

Ukuran limfoblas besar, bentuknya homogen, rasio inti sitoplasmanya lebih rendah dari L1. Sitoplasma sedang, warna basofilik kuat dan vakuolisasi yang mencolok. Bentuk inti teratur bulat sampai lonjong dengan kromatin inti yang halus dan homogen, sering terdapat vakuolisasi. Anak inti biasanya mencolok, dapat satu atau lebih. Sebagian besar kasus LLA L3 mempunyai fenotipe sel B matur, yang mempunyai imunoglobulin membran permukaan atau "surface membran immunoglobulin " (SmIg) Dapat pula menunjukkan fenotipe sel T atau bentuk gabungan sel T dan B.

Selain dari pemeriksaan morfologis dan sitokimia diatas terdapat klasifikasi FAB MPO, yang hanya ditegakkan melalui (Wirawan R, Kosasih A,



Setiabudi R, 1993)

1. Menunjukkan aktifitas MPO dengan sitokimia menggunakan mikroskop elektron
2. Menunjukkan protein MPO dengan antibodi monoklonal CD 13 dan CD 33 yang positif (spesifik mieloid).

#### B. Macam macam pemeriksaan untuk menunjang diagnosis leukemia akut

1. Pengecatan Romanowsky
2. Pengecatan sitokimia dan imunositokimia
3. Petanda imunologik
4. Sitogenetik
5. Biokimiawi
6. Kultur

Karena pengecatan Romanowsky, sitokimia dan imunositokimia tidak memerlukan peralatan yang mahal dan canggih maka penulis membatasi hanya memeriksa hal hal tersebut dalam penelitian ini.

#### 1. Pengecatan Romanowsky : (Dacie, 1995)

Terdiri dari : May - Grunwald

Jenner

Giemsa

DPT-POSTAK-UNDIP

### Leishman

Bagian terpenting dari cat Romanowsky adalah Azure B ( trimethylthionin ) dan Eosin Y ( Tetrabromo fluoroscein ) . Pada awalnya digunakan methylene blue dan eosin. Diantara pengecatan Romanowsky yang paling sederhana ialah cara Jenner sedangkan terkompleks ialah cara Giemsa, diantaranya cara Leishman. Bila Ph lebih alkalis dari yang ditetapkan ( idealnya Ph : 6,8 ) maka komponen Azure lebih menonjol dari komponen eosin dan sebaliknya. Azure B dalam bentuk senyawa Dimer terikat dengan anion , Eosin Y dalam bentuk senyawa monomer terikat pada bagian kation dari protein .

Asam nukleat dan protein dari inti sel dan sitoplasma terikat pada bagian basa dari Azure B dan molekul Hb yang bersifat basa terikat pada eosin.

Granul eosinofil mengandung spermin yang bersifat alkalis terikat kuat oleh komponen eosin, granul basofil bersifat asam mengandung heparin terikat oleh Azure B. Dapat digunakan 50 ml dari 66 mmol /L bufer Sorensen.

Cara pembuatan larutan stok : 1 gram bubuk cat masukkan tabung konikal kapasitas 200- 250 ml. Tambahkan 100ml methanol , panaskan 50 ° C selama 15 menit dengan diaduk perlahan , lalu saring . Untuk membuat larutan kerja encerkan larutan stok 9 kali.

Pemeriksaan Giemsa pada darah tepi penderita leukemia akut :

Hapus darah tepi yang dicat Giemsa harus diamati dengan teliti <sup>(Mc. Glave PB, 1988)</sup>

Ditemukannya batang Auer dapat menentukan suatu LNLA sebelum dilakukan pemeriksaan lebih lanjut <sup>(Mc. Glave PB, 1988)</sup> . Seperti diketahui menurut FAB leukemia akut dibagi menjadi LNLA & LLA, untuk menentukan subtipe LNLA kadang kadang bisa dengan Giemsa saja sudah cukup, bila tidak perlu pemeriksaan bantu untuk menegakkan diagnosis . Bila kita sudah dapat menegakkan diagnosis LLA kita dapat membedakan subtipe LLA dengan cara Whitaker .

**SISTIM SKORING UNTUK MENENTUKAN LEKEMI LIMFOSITIK AKUT  
TERMASUK SUBTIPE L1 ATAU L2. ( CARA WHITAKER )**

- \* Rasio inti sitoplasma tinggi (Sitoplasma kurang dari 25% dari keseluruhan sel) didapat pada sekurang-kurangnya 75% sel.....+1
- \* Rasio inti sitoplasma rendah (Sitoplasma  $\geq$  20% dari keseluruhan sel) didapat pada sekurang-kurangnya 25% sel.....-1
- \*  $\geq$  75% sel memiliki tidak lebih dari 1 anakinti.....+1
- \*  $\geq$  25% sel memiliki 1 atau lebih anak inti yang dominan.....-1
- \* Permukaan inti ireguler (reniform atau terdistorsi luas oleh tonjolan lebar atau celah didapat pada  $\geq$  25%sel.....-1
- \* Sel sel besar (Diameter paling tidak dua kali limfosit kecil) meliputi  $\geq$  50%..-1

Jumlah skor 0 sampai +2 merupakan L1

Jumlah skor -1 sampai -4 merupakan L2

Untuk L3 : Sel sel berwarna basofilik besar besar seukuran dengan inti bundar , granula kromatin " dense " , satu atau lebih anak inti yang dominan (Henderson ES, 1986)

## 2. Pengecatan sitokimia

Dengan menggunakan prinsip reaksi biokimia, maka reagensia / pereaksi tertentu yang dipergunakan dalam teknik pengecatan sel darah ini dapat mendeteksi adanya enzim spesifik dan atau bahan produk intraseluler yang terdapat dalam eritrosit, leukosit serta trombosit. Hasil reaksi biokimia yang berupa endapan berwarna : difus, granuler atau merupakan benda inklusi berbeda secara kualitatif (khas) dalam masing-masing individu sel darah dan dapat secara kuantitatif (gradual) sesuai tingkat maturasinya dalam satu sistim / seri sel darah tertentu (Bambang Sutrisno, 1991)

### Macam Pengecatan Sitokimia

Seperti telah disebutkan diatas, pengecatan sitokimia dapat dilakukan baik terhadap eritrosit, leukosit maupun trombosit. Pengecatan terhadap eritrosit dilakukan untuk membantu membedakan serta menentukan berbagai jenis anemi, sedangkan terhadap leukosit terutama untuk kepentingan diagnosis leukemia akut dan terhadap trombosit bila diperlukan pada kasus khusus yang mengenai megakariosit (Bambang Sutrisno, 1991)

Untuk keperluan diagnostik leukemia akut serta berdasarkan apa yang dapat ditentukannya, pengecatan sitokimia untuk leukosit dibagi menjadi dua bagian besar yakni (Lanzkowsky P, 1980) :

1. Ensimatik :

- Peroksidase
- Esterase
- Phosphatase
- Beta – glucuronidase
- Aryl sulfatase

2. Non Ensimatik

- Sudan Black B
- Periodic acid schiff (PAS)
- Oil red O
- Methyl Green Pyronine

Pengecatan sitokimia untuk eritrosit dipakai untuk mendeteksi adanya " Free Iron " , derivat derivat hemoglobin dan ensim metabolik / sitoplasmik tertentu didalam eritrosit ( Catovsky, 1995 ). Sedangkan terhadap trombosit pengecatan sitokimia dipakai untuk mendeteksi " platelet peroxidase reaction " yang terdapat didalam retikulum endoplasmik dan membran inti megakariosit muda atau yang sudah matur ( Catovsky, 1995 )

## 2.1 Sudan Black B ( SBB )

Sudan Black B mewarnai berbagai macam lipid, diantaranya sterol, fosfolipid dan lemak netral yang terdapat pada granula seri mielositik dan monositik, dimana akan tercat coklat kehitaman dengan intensitas yang semakin padat sesuai dengan maturasi dari sel <sup>(Brown B, 1976)</sup>. Seri monositik tercat positif berupa granula halus yang terbesar difus ("Finely scattered granules") <sup>(Catovsky D, 1995)</sup>

SBB mengecat membran lipid dari granula yang mengandung enzim mieloperoksidase didalamnya, dan mekanisme pengecatannya sama dengan peroksidase dimana melalui mekanisme enzimatik tidak hanya melalui sifat fisik larutan cat <sup>(Catovsky D, 1995)</sup>. Sehingga dengan demikian maka kepentingan pengecatan ini adalah sama dengan pengecatan mieloperoksidase dalam hubungannya dengan diagnosa leukemia akut <sup>(Bambang Sutrisno, 1991)</sup>. Dalam mengevaluasi hasil pengecatan sitokimia ini perlu diketahui bahwa untuk sistim granulopoietik sudanofilia negatif dalam mieloblas kemudian secara gradual menjadi positif sesudah promielosit dengan intensitas yang semakin padat sesuai dengan peningkatan maturasi sel, sedangkan untuk monositik, monoblas negatif kemudian terdapat granula yang bereaksi positif menyebar tidak menggerombol / memadat seperti pada granulopoietik <sup>(Bambang Sutrisno, 1991)</sup>

## 2.2 Mieloperoksidase ( MPO )

Mieloperoksidase merupakan enzim lisosomal yang terdapat pada granula azurofilik dari neutrofil dan monosit <sup>(Catovsky, 1995)</sup>

- ◆ Sel yang bereaksi positif pada pengecatan mieloperoksidase :  
Promielosit, mielosit, metamielosit, batang dan segmen. Eosinofil dan

basofil bereaksi positif kuat. Promonosit dan monosit juga bereaksi positif

◆ Sel yang bereaksi negatif :

Mieloblas pada fase awal , Monoblas , Limfoblas dan limfosit.

Reagen yang dipakai untuk menunjukkan enzim ini ialah bensidin dan hidrogen peroksida. Bensidin mengikat On hasil reaksi enzim mieloperoksidase dengan hidrogen peroksida. Timbul warna hijau khaki sampai kecoklatan hitam.

Soemantri AG ( 1978 ) dalam disertasinya untuk mempertahankan gelar doktor berjaudul : “ Hubungan Anemi Kekurangan Zat Besi Dengan Konsentrasi Dan Prestasi Belajar “ menggunakan cara Kasplov ( 1965 ) untuk mengecat MPO. Bensidin dihidrochlorida dan 3,3 diamino -benzidine ( DAB ) tetra hydrochlorid dipilih menggantikan bensidin karena tidak karsinogenik ( Catovsky, 1995 )

Manfaat utama pengecatan MPO ialah membedakan LLA dan LNLA.

Auer Rod dan ‘ Phi bodies ‘ lebih jelas dengan pengecatan MPO dibandingkan May-Grunwald Giemsa karenanya mempunyai sensitifitas lebih tinggi dalam menentukan LNLA ( Catovsky , 1995 ).

Mieloblas merupakan sel imatur yang menunjukkan aktifitas mieloperoksidase , bila negatif bisa berarti blas tipe lainnya . Pada MPO dari LNLA dijumpai Mieloblas tahap dini yang menunjukkan aktifitas mieloperoksidase negatif ( Catovsky, 1995 ).

### 2.3 Esterase

Menurut Li dkk. Seperti yang dikutip oleh Dacie 5 didalam lekosit dijumpai 9 macam isoensim esterase yakni iso enzim 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9.

Oleh karena itu maka dalam pengecatan sitokimia ini dipergunakan berbagai macam substrat sesuai dengan keperluannya.

Isoensim 1, 2, 7, 8 dan 9 merupakan esterase “spesifik” yang didapatkan pada seri granulopoeitik serta dapat dideteksi dengan mempergunakan isoensim 3, 4, 5, dan 6 merupakan “non spesifik esterase” yang sensitif terhadap NaF dan dapat ditunjukkan dengan mempergunakan substrat alpha naphthol ester (acetat dan butirat). Iso ensim ini dijumpai pada monosit, megakariosit, dan trombosit (Catosky D, 1995)

Naphthol AS atau alpha naphthol ester dapat bereaksi hampir dengan semua isoensim namun reaksinya akan dihambat oleh NaF bila untuk mendeteksi isoensim yang non spesifik diatas (Catosky D, 1995)

a. ANAE (Alpha Naphthol Acetate Esterase)

Pada pengecatan sitokimia ini sering digunakan untuk keperluan konfirmasi identifikasi sel darah baik dalam keadaan normal maupun lekemi (Bambang Sutrisno, 1991). Dalam keadaan normal dipakai untuk membedakan limfosit T dengan monosit berdasarkan pola reaksinya :

- Pada limfosit berbentuk bercak.
- Pada monosit merata.

Serta sensitif tidaknya terhadap NaF :

- Pada limfosit resisten
- Pada monosit sensitif



Dalam keadaan lekemi dan kelainan limfoproliferatif, peranan pengecatan ini adalah sebagai berikut : (Catosky D , 1995)

- Pada LNLA memperkuat diagnosis lekemi monositik.
- Pada LLA disertai pengecatan fosfatase asam akan membantu identifikasi LLA dari sel T.
- Pada lekemi limfositik kronik pengecatan ini dapat membantu membedakan lekemi prolifositik dari sel T (bereaksi positif) dengan lekemi prolifositik B (yang bereaksi negatif)

b. NASA (Naphthol AS Acetate) Dan NASDA (Naphthol AS - D Acetate)

Kedua substrat ini digunakan untuk memperlihatkan aktifitas esterase non spesifik pada seri monosit (Catosky D , 1995). Tidak seperti ANAE, keduanya tidak menunjukkan reaksi lokal pada limfosit T. Suasana terbaik untuk reaksi adalah pada Ph 6, 9, tetapi perlu diperhatikan bahwa inkubasi yang berkepanjangan menyebabkan hidrolisa substrat oleh "Chloracetate esterase" dari granulosit. Karena itu perlu ditambahkan NaF pada waktu inkubasi sehingga dapat dibedakan dengan jelas promonosit dan monosit dari promielosit dan mielosit (Catosky D , 1995). Jika dipergunakan substrat ANAE maka NaF tidak terlalu diperlukan karena reaksinya pada seri monositik lebih kuat dan reaksi pada seri granulosit lemah atau negatif (Catosky D , 1995)

NASDA lebih disenangi dari pada NASA karena hasil reaksinya lebih kurang dan lebih tidak menyebar (Catosky D, 1995)

Kepentingan utama dari pengecatan ini ialah untuk membedakan tipe mieloblas pada M1 dan M2 dan tipe monosit pada M5a dan M5b. Sedangkan pada M4 membantu menentukan jumlah relatif dari komponen monositik (Catosky D, 1995)

c. "Chloracetate Esterase"

Esterase spesifik yang terdapat pada granulosit dan sel mast berbeda dari yang ada pada monosit dan megakariosit, keberadaannya dapat diperlihatkan menggunakan substrat "Fast Garnet GBC", "Fast Red Violet" atau "Fast Blue BB". Dengan menggunakan Ph 7,0 - 7,6 serta tidak dipengaruhi NaF maka hasil positif didapat pada seri granulosit baik matur maupun imatur (Catosky D, 1995). Secara umum hasil reaksi ini sejajar dengan Sudan Black B maupun peroksidase (Catosky D, 1995). "Auer rod" sering positif, limfosit dan monosit hanya sedikit atau tidak memiliki aktifitas enzim ini sama sekali (Catosky D, 1995).

Kelebihan metoda ini dapat dipergunakan untuk potongan jaringan pada parafin, dengan jaringan dari berbagai macam bagian tubuh sehingga dapat digunakan untuk membantu diagnosa "sarcoma" ("Chloroma") (Catosky D, 1995). Substrat ini dapat dipakai secara bersamaan dengan ANAE dalam satu pengecatan sitokimia yang disebut "Combined" atau "Dual" esterase. Sebagai hasil dari pengecatan tersebut dalam preparat yang sama akan dapat ditunjukkan kedua macam esterase (spesifik

pada seri granulositik dan non spesifik pada monositik). Dengan demikian maka pengecatan ini sangat bermanfaat untuk diagnosa lekemi mielomonositik akut (M4).

#### 2.4 Pengecatan sitokimia pada sel darah normal

Tabel 2: HASIL PENGECATAN SITOKIMIA PADA SEL SEL DARAH

Keadaan / Sel Darah	MPO	SBB	PAS	Alk. Phos
Mieloblas	-	-	-	-
Promielosit	++++	++++	++	±
Mielosit	++++	++++	++++	±
Metamielosit	++++	++++	++++	+
Neutrofil	++++	++++	++++	+ - +++++
Eosinofil	++++	++++	- / +	-
Basofil	-	++++	- / +	-
Limfosit	-	-	-	-
Monosit	± - ++	± - +	± - +	-
Megakariosit	-	±	++++	-
Trombosit	-	±	++++	-
Normoblas	-	-	-	-

(Sumber : Sutrisno B, 1991)

## 2.5 Cara membedakan LNLA dengan LLA

Tabel 3 : KARAKTERISTIK SEL SEL PADA LLA DAN LNLA

	ALL	ANLL
Morfologi		
- Auer rod	-	Sering +
Sitokimia		
- MPO	-	Sering +
- SBB	-	Sering +
Chloracetate esterase	-	Sering +
PAS	+ bervariasi	+ pada FAB M4
Esterase non spesifik	+ fokal (jarang)	+ pada FAB M4
Terminal deoxynucleotidyl transferase	+	-

( Sumber : Mc Glave P, 1988)

Setelah mengetahui LLA atau LNLA selanjutnya ditentukan subtipe masing-masing. Penentuan subtype diperoleh dengan melaksanakan pemeriksaan sitokimia. Macam pemeriksaan sitokimia yang dilakukan dalam penelitian ini ialah : MPO, CLE, BUE, TdT.

Tabel 4 : HASIL PENGECATAN SITOKIMIA PADA LEKEMI AKUT

Keadaan /sel darah	MPO	SBB	PAS	Acid phos	ANAE	NASDA
LNLA M1	+	+	+difus	-atau+	-	+
LNLA M2	++	++	+difus	+	±	+
LNLA M3	+++	+++	++difus	+atau++	±	++
LNLA M4	+atau++	+atau++	+atau++	+atau++	+atau++	+atau++
LNLA M5	-atau+	-atau+	+atau++	+++	+++	+++
LNLA M6	+(blas)	+(blas)	+(blas)	±	-atau+	+
Common ALL (L1-L2)	-	-	+atau++	-atau+	-	-
Null-ALL (L1-L2)	-	-	-atau++	-atau++	-atau+	-
T-ALL (L1-L2)	-	-	-atau+	+++---	+atau++	-
B-ALL (L3)	-	-	-	-	-	-
Batang Auer	++++	++++	-	-	+	++++

(Sumber : Bambang Sutirno 1991)

Tabel 5: GAMBARAN MORFOLOGIS DAN SITOKIMIA PADA LNLA

	SUBTIPE	MORFOLOGIS	BATANG AUER	GAMBARAN SITOKIMIA		
				SBB	CLE	NON SPESIFIK ESTERASE
M0	AML tanpa maturasi	Mieloblas tanpa granule	-	-	-	-
M1	AML dengan maturasi minimal	Mieloblas dengan atau tanpa granule yang jelas	±	+	±	-
M2	AML dengan maturasi	Mieloblas dengan granule, promielosit, beberapa mielosit	+	+	±	-
M3	Akut promielositik leukemia	Promielosit dengan granule yang jelas	++	+	+	-
M3v		Promielositik hipogranuler	+	+	+	-
M4	Akut Mielomonositik leukemia	Mieloblas dan promielosit >20% sel sumsum tulang. Promonoblas dan monoblas >20%	±	+	+	+*
M4	Eosinofil Basofil		±	+	+	+*
M5a	Akut monoblastik leukemia tanpa deferensiasi	Monoblas besar dengan kromatin inti tersusun serupa serat benang pada kain, sitoplasma yang banyak	-	-	-	***
M5b	Akut monoblastik leukemia dengan deferensi	Monoblas, promonosit, monosit, monositosis di darah	-	-	-	***
M6	Akut Eritro leukemia	Megaloblastik Eritroid precursor (>50%) ; Mieloblas (>30%)	+	+	-	±
M7	Leukemi Megakariositik	Megakarioblas, morfologi limfoid (L1, L2, M1), Budding pada sitoplasma	-	-	±	±***

(Sumber : Lukens J, 1993)

## Keterangan :

- + : biasanya terdapat
- ++ : terdapat dalam jumlah besar
- : biasanya tidak terdapat
- ± : bisa terdapat atau tidak terdapat
- \* : Terinhibisi secara inkomplit dengan NaF
- \*\* : Terinhibisi oleh NaF

Variasi lain dari LNLA :

- Eosinofilik leukemi , Basofilik leukemi (MC Glave PB).

Gambaran sitokimia leukemi-mielositik akut tanpa maturasi ( M1 )

Dengan pewarnaan SBB atau MPO minimal 3 % blas M1 harus bereaksi positif. Menurut Hayhoe dkk SBB lebih sensitif terhadap prekursor granulositik dibandingkan MPO. Blas pada M1 juga bereaksi positif dengan Chloro esterase (CLE) . Dengan Non spesifik Esterase (NSE) dan Periodic Acid Schiff (PAS) blas M1 bereaksi negatif <sup>(Wirawan R, Kosasih A, Setiabudi R, 1993)</sup>

Gambaran sitokimia leukemi mielositik akut dengan maturasi ( M2 )

Pewarnaan sitokimia hampir sama dengan M1, akan tetapi reaksinya lebih kuat dan persentase sel blas yang positif dengan SBB dan MPO lebih tinggi. Pada M2, CLE bereaksi positif lebih kuat dibanding M1. Batang Auer lebih banyak dijumpai dari M1 <sup>(Wirawan R, Kosasih A, Setiabudi R, 1993)</sup>

### Gambaran sitokimia leukemia promielositik akut ( M3 )

Pewarnaan sitokimia SBB, MPO, dan CLE bereaksi positif kuat. PAS memberikan reaksi positif lemah yang difus atau "dust like". Pada M3 eritroblas biasanya bereaksi negatif dengan PAS.

Fosfatase asam (Fas) bereaksi positif kuat. Pada M3v memberikan reaksi sitokimia yang serupa dengan M3.

Dengan MPO atau SBB, sel blas tipe M3v bereaksi positif kuat dan hampir mendekati 100%, sedangkan dengan NSE bereaksi positif lemah. LNLA tipe M4 dan M5 bereaksi lemah dengan MPO atau SBB akan tetapi bereaksi positif kuat dengan NSE (Wirawan R, Kosasih A, Setiabudi R, 1993)

### Gambaran sitokimia leukemia mielomonositik akut ( M4 )

Seri monosit dapat dibedakan dengan granulosit dengan bantuan pewarnaan sitokimia NSE memakai substrat alpha naphthyl acetate esterase (ANAE) yang fluorid sensitif, atau dengan alpha naphthyl butyrate esterase (ANBE).

Apabila ditemukan eosinofil abnormal lebih dari 5% dari sel non eritroid sumsum tulang maka disebut M4 dengan eosinofilia (M4e). Eosinofil abnormal sering berinti satu dan mempunyai granula basofilik yang kasar disamping granula eosinofil normal.



Pemeriksaan CLE dan PAS dapat membedakan eosinofil abnormal pada M4e dengan eosinofil normal tidak bereaksi (Wirawan R, Kosasih A, Setiabudi R, 1993)

#### Gambaran sitokimia leukemia monositik akut ( M5 )

Pewarnaan SBB dan MPO untuk M5a sering bereaksi negatif, bila positif membentuk granula halus. Dengan CLE bereaksi negatif atau positif lemah. Hayhoe dkk mendapatkan bahwa SBB lebih sensitif untuk mendeteksi monoblas. Dengan SBB monoblas bereaksi positif membentuk granula halus yang difus, sedangkan mieloblas reaksinya lebih kuat dan "block". Monoblas bereaksi positif kuat dengan NSE baik ANAE ataupun ANBE. Dengan pewarnaan fosfatase asam (Fas) monoblas bereaksi positif difus. Dengan PAS monoblas bereaksi negatif atau positif difus yang disertai PAS positif berbentuk granula halus sampai kasar atau kadang-kadang berbentuk balok. Pada M5 skor NAP biasanya normal atau meningkat.

#### Gambaran sitokimia pada Eritroleukemi ( M6 )

Pewarnaan SBB dapat dijumpai populasi netrofil yang bereaksi negatif dengan MPO juga demikian. PAS eritroblas menunjukkan reaksi positif difus atau berupa granula halus, kadang-kadang disertai PAS positif berbentuk

granula kasar atau balok. Menurut Hayhoe dkk reaksi positif yang berbentuk granula kasar atau balok biasanya dijumpai pada eritroblas awal, sedangkan positif PAS difus dijumpai pada eritroblas akhir atau eritrosit. PAS positif tidak patognomonik untuk M6 karena akan memberi reaksi serupa pada MDS, anemi defisiensi besi, anemi hemolitik berat, talasemia mayor dan pada megaloblastik. Eritroblas M6 bereaksi positif dengan Fas dan NSE. Reaksi positif Fas berlokasi pada daerah Golgi.

#### Gambaran sitokimia pada leukemia megakariositik akut ( M7 )

Megakarioblas bereaksi negatif dengan SBB, MPO, dan CLE. Dengan PAS bereaksi positif berbentuk granula dengan latar belakang merah difus. Granula positif PAS sering terlihat pada pinggir sitoplasma terutama pada tonjolan ("cytoplasmic bleb"). Dengan NSE bereaksi positif dan bersifat florid sensitif. ANAE memberikan reaksi positif yang bervariasi, dapat lemah sampai kuat. Sedangkan ANBE memberikan reaksi negatif atau positif lemah. Dari reaksi NSE, M7 dapat dibedakan dengan seri monositik yang memberikan reaksi kuat baik ANAE maupun ANBE. Akan tetapi perlu diingat bila seri megakariositik, megakariosit yang sangat imatur, PAS dan NSE juga bereaksi negatif. Untuk catatan MPO hanya positif pada MPO permukaan tetapi bila dilakukan pemeriksaan ultra struktur menggunakan

mikroskop elektron menunjukkan megakarioblas yang menyerupai limfoblas, berbentuk kecil, rasio inti sitoplasma tinggi. Sel yang lebih matang kelihatan lebih besar dan mempunyai granula alpa, "bull's eye granules" atau "demarcation membran". Dengan pewarnaan sitokimia ultrastruktur megakarioblas menunjukkan aktifitas enzim peroksidase (MPO) yang terletak pada retikulum endoplasmik dan rongga perinukleus.

1991 FAB menetapkan bila >3 % blas positif dengan SBB atau MPO maka diagnosis LNLA dapat ditegakkan. Akan tetapi bila blas bereaksi negatif atau positif <3% terhadap SBB adan atau MPO, dapat pula masuk dalam klasifikasi LNLA pada keadaan di bawah ini (Wirawan R, Kosasih A, Setiabudi R, 1993)

1. Lekemi mielositik akut dengan diferensiasi minimal
2. Lekemi monositik dengan maturasi minimal (M5a)
3. Lekemi akut dengan petanda eritroid imatur pada sel blasnya (M6 dengan maturasi minimal)
4. Lekemi megakariositik akut (M7)
5. Lekemik basofilik akut atau lekemi sel Mast tanpa maturasi.

## 2.6 Imunositokimia

"Cell markers" (Catosky D, 1995)

Sel dapat diidentifikasi tidak hanya secara morfologis dan pengecatan

sitokimia tetapi juga oleh terdapatnya reseptor dan antigen yang karakteristik pada membran sel. Seperti molekul immunoglobulin pada membran (SmIg) dan atau sitoplasma (CyIg) dan oleh enzim dalam inti seperti Terminal Deoxynucleotidyl Transferase (TdT)

Terminal deoxynucleotidyl Transferase (TdT) (Catosky D., 1995)

DNA polimerase ini dapat ditunjukkan dengan metoda biokimia dan test imunofluorescence. Keduanya memberikan hasil yang sama baik. Tes alkaline phosphatase anti alkaline phosphatase (APAAP) lebih disukai karena kesederhanaannya dan kesensitifannya. TdT positif pada hampir semua LLA kecuali LLA - B yang jarang. Perlu dicatat bahwa 15 - 30% kasus LNLA, terutama bentuk-bentuk imatur, akan memperlihatkan aktifitas TdT. Aktifitas TdT akan terlihat pada LLA yang bifenotipik, 30-50% kasus LNLA M1 (peroksidase positif) dan M0 (peroksidase negatif) karena TdT aktifitasnya terdapat pada mieloblas.

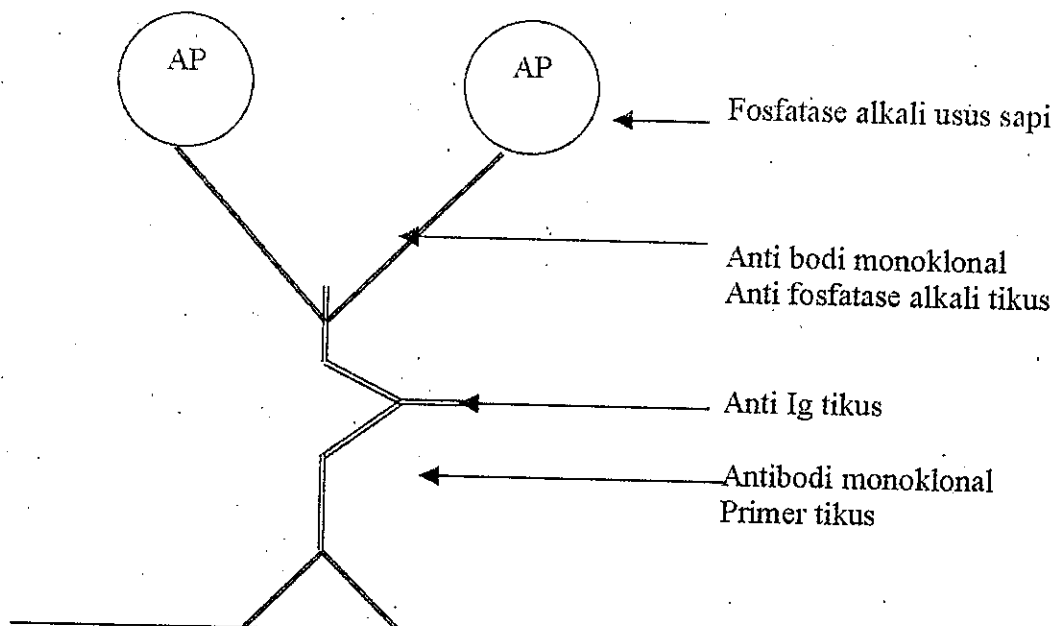
Tiga situasi dimana TdT memberikan informasi berharga :

1. Pada CML dengan blas krisis, TdT hampir selalu positif pada transformasi blas tipe limfoblastik (20% kasus)
2. Pada limfoma limfoblastik T, merupakan satu-satunya Limfoma Non Hodgkin dengan aktifitas TdT positif.

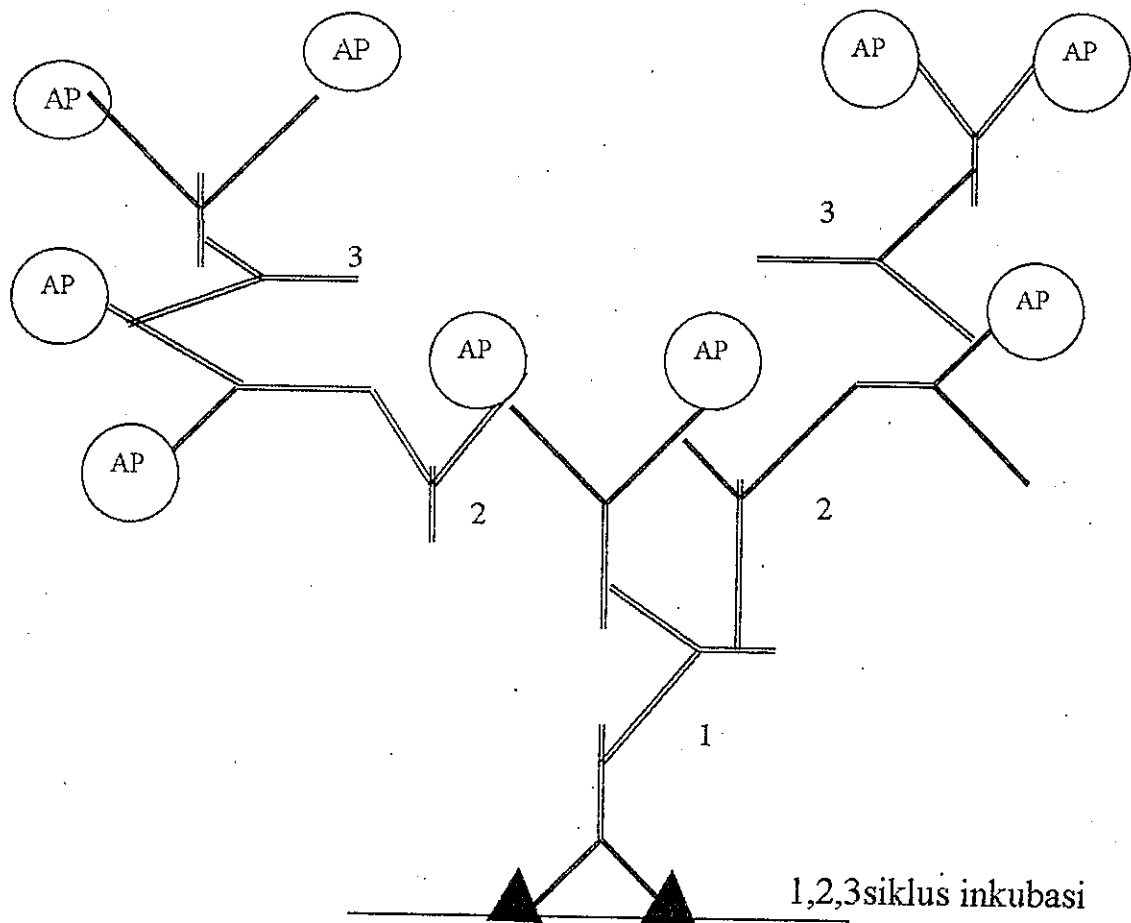
3. Pada proliferasi sel T matur (bentuk kronik) dimana aktifitas TdT selalu absen, berbeda dengan bentuk proliferasi sel T imatur (LLA - T, LLA - pre T dan limfoma limfoblastik T) dimana aktifitas TdT positif.

**METODA APAAP** (Mason DY, Erber WN, 1991)

APAAP "imunoalkaline phosphatase labeling" terdiri dari 3 lapisan reagen seperti tertera pada gambar dibawah ini : Complexes APAAP



Gambar 2 :Skematik diagram APAAP ( Sumber: Mason DY,Erber WN,



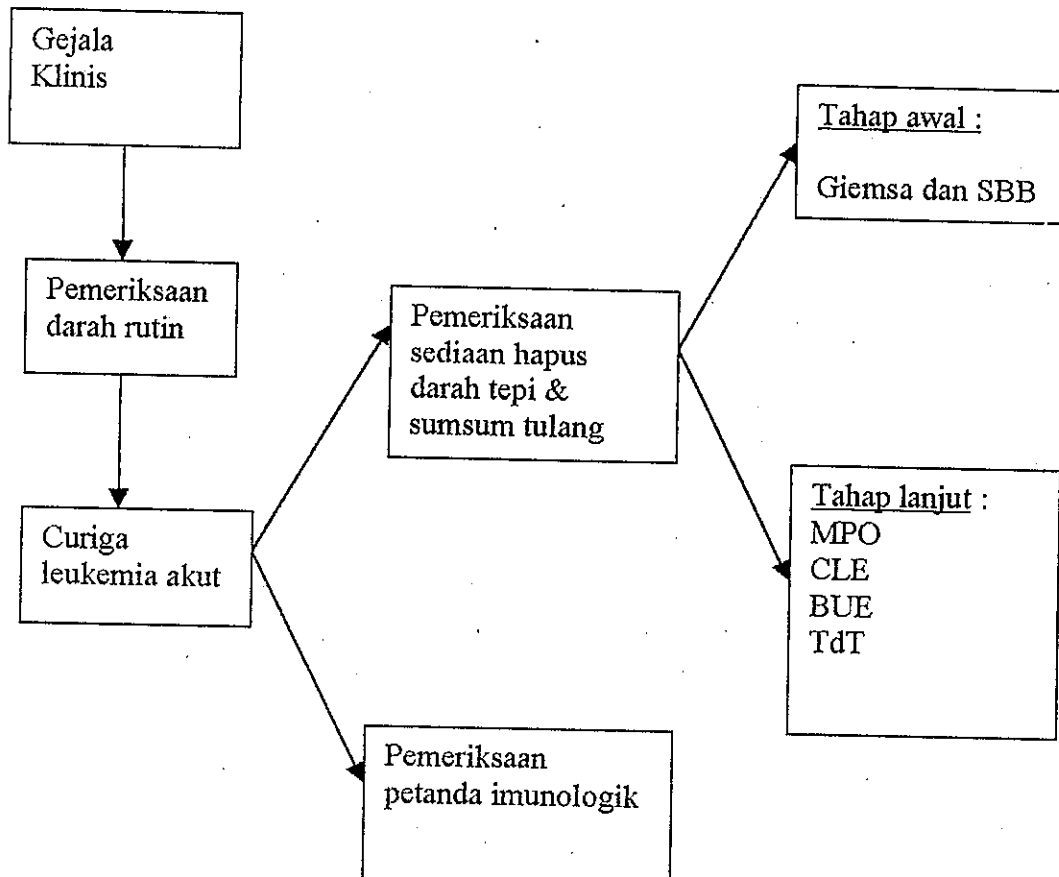
Gambar 3 : Prosedur inkubasi ( Sumber : Mason DY, Erber WN, 1991)

Pengulangan dari "bridging" anti mouse Ig dan tahap-tahap prosedur APAAP meningkatkan secara bermakna ikatan alkali fosfatase dan akhirnya meningkatkan intensitas. (Mason DY, Erber WN, 1991)

Keuntungan praktis metoda APAAP :

1. Dapat digunakan untuk mikroskop cahaya.
2. Visualisasi antigen intraseluler
3. Penyimpanan sediaan sebelum di cat
4. Kualitas pengecatan bertahan untuk waktu lama
5. Deteksi sel yang jarang
6. Cocok untuk sample yang sedikit

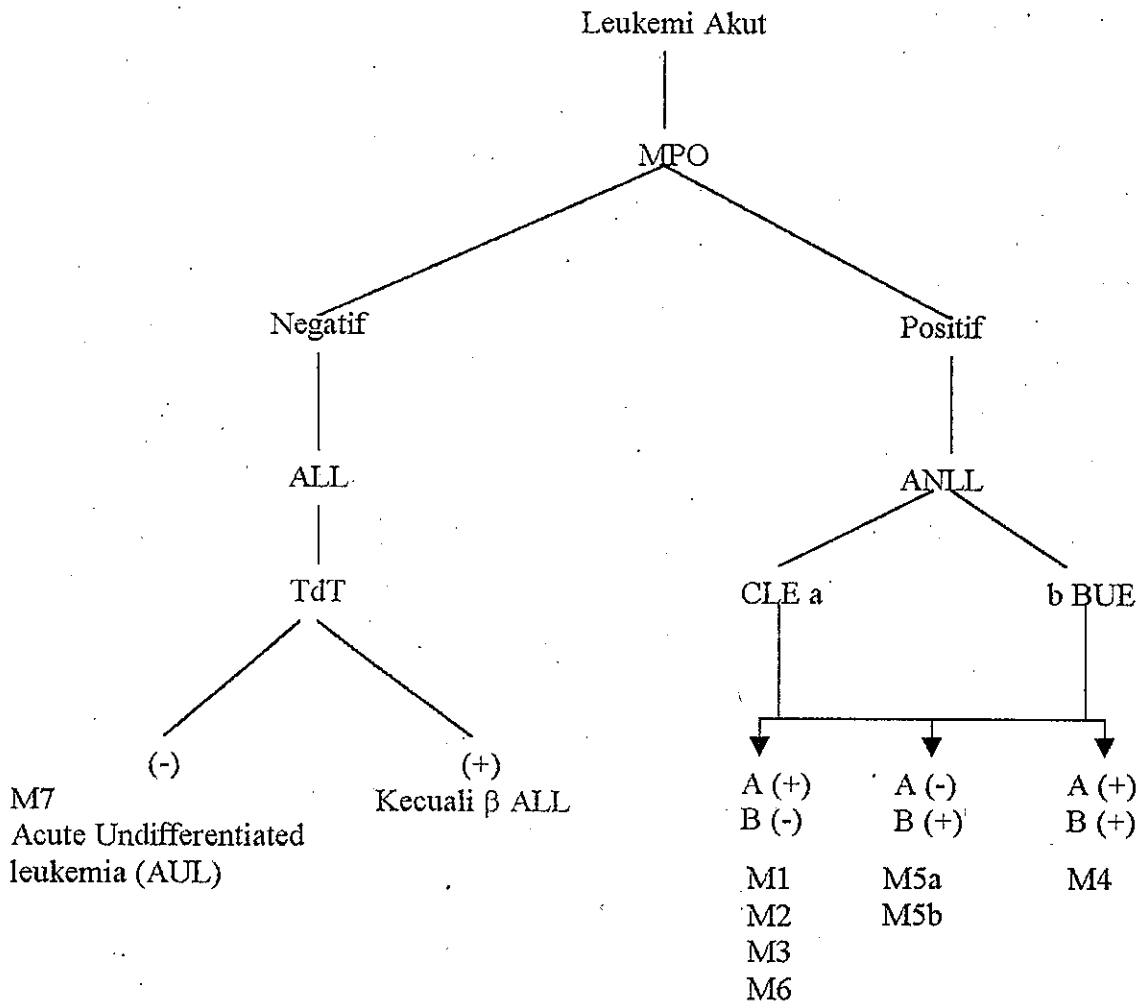
## PROSEDUR DIAGNOSTIK PENDERITA LEUKEMIA AKUT



Penderita dengan gejala klinis leukemia akut diperiksa darah rutin setelah sesuai penderita dinyatakan curiga leukemia akut, lalu dilakukan pemeriksaan sediaan hapus darah tepi & sumsum tulang, sebagai tahap awal dilakukan pengecatan Giemsa & SBB yang umum dilakukan di Bagian Patologi Klinik FK UNDIP / RSUP Dr Kariadi kemudian dilakukan pemeriksaan tahap lanjut dengan sitokimia dan imunositokimia.

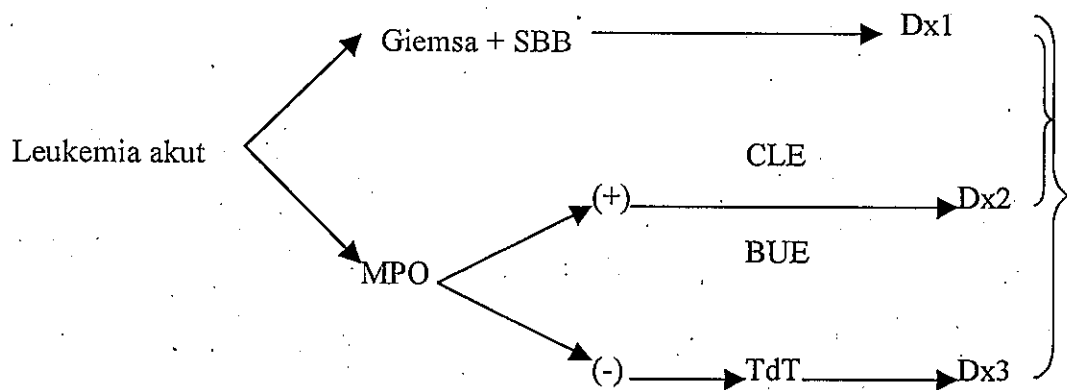


## PENDEKATAN DIAGNOSTIK



Penderita yang dicurigai leukemia akut seluruhnya di cat MPO, bila hasilnya positif berarti termasuk LNLA, pada kelompok ini dilanjutkan pengecatan CLE dan BUE. Hasil pengecatan MPO yang negatif berarti LLA dilanjutkan pengecatan TdT. Hasil pengecatan selanjutnya dapat dilihat pada skema diatas.

## STRATEGI PENELITIAN



Diagnosis 1 dibandingkan dengan diagnosis 2.

Diagnosis 1 dibandingkan dengan diagnosis 3.

Kemudian dicari sejauh mana kesesuaian konfirmasi diagnosis morfologisnya.

Penderita dengan kecurigaan leukemia akut dilakukan pengecatan sediaan hapus darah tepi dan sumsum tulang Giemsa dan SBB dievaluasi hasil diagnosis morfologisnya ; Juga pada penderita yang sama di lakukan pengecatan sediaan hapus darah tepi dan sumsum tulang MPO bila positif dilanjutkan CLE dan BUE, bila negatif dilanjutkan TdT masing masing dievaluasi hasil diagnosis morfologisnya.



### BAB III

## METODA PENELITIAN

### A. Ruang lingkup

Keilmuan : Ilmu patologi Klinik khususnya hematologi.

Ilmu Penyakit Dalam dan Ilmu Kesehatan Anak khususnya  
Hematologi

Wilayah dan tempat :

Jawa Tengah

Semarang : RSUP Dr. Kariadi, RS St. Elizabeth, RS Telogorejo.

Waktu : Maret s/d September 1998

### B. Rancangan penelitian

Rancangan yang digunakan pada penelitian ini adalah " Studi deskriptif analitik " dengan pendekatan Belah Lintang.

### C. Sampel dan Populasi

Sampel penelitian diambil secara " Consecutive sampling " dari penderita dengan klinis dan pemeriksaan darah rutin dicurigai leukemia akut yang di rawat inap di RSUP Dr. Kariadi, RS St. Elizabeth, RS. Telogorejo dengan kriteria :

- Semua usia
- Pria maupun wanita
- Belum mendapat terapi sitostatik untuk leukemia akut

#### **D. Bahan penelitian**

- Sediaan darah tepi di cat Giemsa
- Sediaan hapus sumsum tulang diambil dari aspirasi sumsum tulang

#### **E. Alat atau instrumen untuk pengumpulan data**

- Data primer
- Data sekunder : mencatat dari CM berupa gejala klinis, umur, jenis kelamin, Hb, jumlah leukosit dan jumlah trombosit.

#### **F. Cara pemeriksaan :**

##### **a. Pemeriksaan laboratorium penunjang :**

Hb

Jumlah leukosit

Jumlah trombosit

**b. Pengecatan pengecatan sitokimia****Pengecatan MPO :**

Reagents : diambil dari Sigma Diagnostics

DIAMINOBENZIDINE, Catalog No. 391-1 Diaminobenzidine tetrahydrochloride,  
25 mg

COPPER NITRATE, Catalog No. 391-2 Copper nitrate, 625 mg

TRIZMA BUFFER CONCENTRATE, Catalog No. 391-3 Trizma Hcl buffer, 1.0  
mol/L

GLUTARALDEHYDE SOLUTION, Catalog No. 380-2 Glutaraldehyde, 4%, dan  
buffer borate 67 mmol/L, pH 7.6

HEMATOXYLIN SOLUTION, GILL No. 3 Catalog No. GHS-3 Hematoxylin  
(certified), 6 g/L, Sodium iodate, 0.6 g/L, aluminium sulfate, 52.8 g/L dan zat  
penstabil

GILL MODIFIED EA SOLUTION, Catalog No. 391-5 Fast Green FCF (certified)  
0.017% (w/v), Eosin Y (certified), 0.4% (w/v), alcohol, 73% (v/v), Metil alkohol  
absolut, 25% (v/v), asam asetat glasial 2% (v/v), asam fosfotungstat 0.4% (w/v)

SCOTT'S TAP WATER SUB STITUTE CONCENTRATE, Catalog No. S 5134  
mengandung Mg SO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 200 g/L, Sodium Bicarbonate, 20 g/L dan pengawet

**Persiapan :**

- Larutkan 1 vial Copper Nitrate dalam 250 mL yang terdeionisasi

- Larutan kerja TRIZMA (pH  $7.6 \pm 0.3$ ) disiapkan dengan melarutkan 1 vol TRIZMA buffer concentrate dengan 9 vol air terdeionisasi
- Fiksasi : campur 25 mL acetone reagent grade dengan 75 mL larutan Glutaraldehyde
- Campur 1 vol Scott's Tap water substitute concentrate dengan 9 vol air terdeionisasi, ini merupakan larutan kerja
- Saring Hematoxyllin Gill No. 3 sebelum digunakan.

Prosedur.

1. Larutkan isi 1 vial Diaminobenzidine, catalog No. 391 -1 dalam 50 ml cairan kerja TRIZMA
2. Segera sebelum menfiksasi preparat, tambahkan  $H_2O_2$  1% 0.5 ml kedalam larutan pada tahap 1.
3. Fiksasi sediaan hapus selama 1 menit pada suhu  $4 - 8 ^\circ C$  dengan Glutaraldehyde-acetone
4. Cuci hati-hati (30 detik) dengan air terdeionisasi.
5. Inkubasikan selama 45 detik dalam larutan yang disiapkan pada tahap 2.
6. Cuci hati-hati (30 detik) dengan air terdeionisasi
7. Celupkan ke dalam larutan copper nitrate selama 2 menit dengan digoyang perlahan
8. Cuci hati-hati (30 detik) pada air terdeionisasi

9. Celupkan dalam larutan Hematoxyllin, Gill No. 3 catalog No. GHS-3 selama 8 detik
10. Cuci 2 kali selama 5 detik dengan digoyang perlahan dalam air terdeionisasi.
11. Celupkan selama 12 detik dalam larutan kerja Scott's Water Substitute
12. Cuci 2 kali selama 5 detik dalam air terdeionisasi.
13. Celupkan selama 1 menit ke dalam Gill Modified EA, catalog No. 391-5
14. Cuci 2 kali setiap kali 3 detik dalam alkohol 95%.
15. Cuci dengan 2 kali pergantian masing-masing 3 detik dalam ethanol absolute
16. Cuci dengan 3 kali pergantian masing-masing 3 detik dengan xylene
17. Sediaan hapus siap di periksa secara mikroskopik

**Pengecatan SBB** (Catovsky D, 1995) :

\* Fiksasi : Formal dehid 40%

\* Larutan pewarna :

- (A) Sudan Black B 0.3 gram dalam 100 ml ethanol absolut. Kocok baik-baik kemudian saring.
- (B) Buffer : 16 gram fenol kristal dalam 30 ml ethaonol absolut, campurkan seluruhnya ke dalam 100 ml air yang telah mengandung 0.3 gram "disodium hydrogen phosphate" ( $\text{Na}_2\text{HP}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ) yang dilarutkan. Campur baik-baik lalu saring. Campurkan 30 ml (60ml) larutan A dengan 20 ml (40ml) larutan B lalu saring. Larutan tersebut dapat disimpan pada  $4^{\circ}\text{C}$  selama 2-3 bulan



- Counterstain : May-Grunwald-Giemsa atau Safranin.

Cara :

Fiksasi sediaan yang telah dikeringkan diudara, selama 10 menit dengan uap formalin dengan cara membasahi kertas saring dengan formalin dan letakkan dalam inkubator pada suhu  $37^{\circ}\text{C}$ . Cuci hati-hati dengan air selama 5 – 10 menit. Masukkan dalam larutan pewarna minimum 30 menit. Lebih lama ( misalnya 1 jam) akan menghasilkan warna yang lebih kuat.

Cuci dengan ethanol 70% dengan cara menggoyang-goyangkan sediaan dalam tabung "Coplin" selama 3-5 menit. Bilas dengan air selama 2 menit, keringkan, counterstain selama 5 menit dan lapis sediaan.

**Pengecatan Naphthol AS-D Chloroacetate Esterase :**

Reagent :

NAPHTHOL AS-D CHLOROACETAT, Catalog No. 91 -1 Naphthol AS-D Chloroacetat, 8 mg /ml dan penstabil

FAST RED VIOLET LB BASE SOLUTION, Catalog No. 91-2 Fast Red Violet LB base, 15 mg/ml dalam 0.4 mol/L HCL dengan penstabil

TRIZMAL 6.3 CONCENTRATE, Catalog No. 91-3 TRIZMA maleate, 1mol/L dengan surfactant. PH  $6.3 \pm 0.15$  pada suhu  $25^{\circ}\text{C}$ .

SODIUM NITRITE SOLUTION, Catalog NO. 91-4 Sodium nitrite, 0.1 mol/L

CITRATE SOLUTION, Catalog No. 91-5 Asam sitrat, 18 mmol/L, sodium sitrat, 9 mmol/L, NaCl 12 mmol/L dengan surfactant, pH  $3.6 \pm 0.1$  pada suhu  $25^{\circ}\text{C}$ .

$\alpha$  - NAPHTHYL ACETATE SOLUTION, Catalog No. 91-6  $\alpha$ - Naphthyl Acetate, 12.5 mg/ml dalam larutan methanol dengan penstabil.

FAST BLUE BB BASE SOLUTION, catalog No. 91-7 Fast Blue BB Base, 15 mg/ml, dalam cairan HCL 0.4 mol/L dengan penstabil.

TRIZMAL 7.6 CONCENTRATE, Catalog No. 91 - 8 Trizmal Maleate, 1 mol/L dengan surfactant pH  $7.6 \pm 0.15$  pada suhu  $25^{\circ}\text{C}$ .

HEMATOXYLIN SOLUTION GILL No.3 , Catalog No. GHS-3 Certified hematoxyllin, 6.0 g/L, Na iodate, 0.6 g/L dan aluminium sulfat, 52.8 g/L dengan penstabil SODIUM FLOURIDE SOLUTION, Catalog No. 91-9

Persiapan :

Hangatkan seluruh reagent pada suhu ruang ( $18-26^{\circ}\text{C}$ ) sebelum digunakan.

- Fiksasi : Tambahkan 65 ml acetone dan 8 ml Formaldehyde 37% dengan 25 ml larutan citrate. Masukkan dalam botol gelas dan tutup rapat-rapat. Simpan dalam lemari es ( $2-8^{\circ}\text{C}$ ), sesuaikan dengan suhu ruangan ( $23-26^{\circ}\text{C}$ ) sebelum digunakan. Stabil sampai 4 minggu bila tertutup rapat dalam lemari es.

Prosedur (dilakukan pada suhu  $37^{\circ}\text{C}$ ) :

1. Hangatkan sejumlah air terdeionisasi sampai mencapai suhu  $37^{\circ}\text{C}$ , ukur suhunya sebelum digunakan.

2. Segera sebelum fiksasi, tambahkan larutan Sodium nitrit dengan 1 ml larutan Fast red violet LB base dalam tabung reaksi. Campur hati-hati dengan memutar dan biarkan selama 2 menit. Harus dijaga jangan sampai terbentuk gelembung.
3. Campurkan larutan dari tahap 2 ke dalam 40 ml air terdeionisasi yang telah dihangatkan.
4. Tambahkan 5 ml TRIZMAL 6.3 buffer concentrate.
5. Tambahkan 1 ml larutan Naphthol AS-D Chloroacetate. Larutan harus berubah merah. Campur sempurna dan tuang ke dalam Coplin Jar.
6. Sesuaikan suhu Citrate Acetone Formaline (CAF) dengan suhu ruang (23-26 °C). Fiksasi sediaan dengan CAF selama 30 detik.
7. Cuci sediaan secara menyeluruh pada air terdeionisasi yang mengalir selama 45-60 detik, lalu masukkan ke dalam cairan dari tahap 5. Jangan sampai sediaan kering sebelumnya.
8. Inkubasikan selama 15 menit pada suhu 37 °C, dilindungi dari cahaya.
9. Setelah 15 menit, angkat sediaan dan cuci dengan air terdeionisasi setidaknya 2 menit.
10. Counterstain dengan Hematoxylin Gill No. 3 selama 2 menit.
11. Cuci dalam air mengalir dan keringkan di udara.
12. Siap diperiksa mikroskopik.

**Pengecatan  $\alpha$  - NAPHTHYL BUTYRATE ESTERASE****Reagent :**

$\alpha$ - NAPHTHYL BUTYRATE SOLUTION, Catalog No. 180-1  $\alpha$ - Naphthyl Butyrate, 2,4 g/L, dalam methanol dengan pelarut.

PARAROSANILINE SOLUTION, Catalog, No. 180-4 pararosaniline, 40 g/L dalam 2 mol /L HCL.

SODIUM NITRITE TABLETS, Catalog No. 180-9 Sodium nitrite, 250 mg setiap tabletnya.

PHOSPHATE BUFFER, Catalog No. 180-5 Sodium dan potassium phosphate.

METHYLENE BLUE SOLUTION, Catalog No. 180-8 Methylene blue, 1.4% (w/v) dalam 95% ethanol.

CITRATE SOLUTION, Catalog No. 91-5 Asam sitrat, 18 mmol/L, sodium sitrat, 9 mmol/L, NaCl, 12 mmol/L, dan surfactant pH harus  $3.6 \pm 0.1$ .

**Persiapan :**

Hangatkan  $\alpha$ - Naphthyl Butyrate Solution sampai mencapai suhu  $37^{\circ}\text{C}$ .

- Cairan sodium nitrite, 4 g/dl, disiapkan dengan mencampur isi 10 tablet dengan 6.26 ml air terdeionisasi, simpan dengan botol tertutup rapat-rapat pada suhu  $2-8^{\circ}\text{C}$ . Hangatkan sampai mencapai suhu ruangan sebelum digunakan, buanglah bila telah terjadi kekeruhan

- Cairan buffer fosfat disiapkan dengan cara melarutkan isi fosfat bufer, catalog No. 180-5 dalam 500 ml air terdeionisasi. Konsentrasi bufer 0.067 mol/L, pH 7.7 pada suhu 25 °C simpan dalam lemari es (2-8 °C), buanglah bila telah terjadi pertumbuhan mikroba.

Catatan : pertumbuhan mikroba dapat dicegah dengan menyaring melalui filter 0.22 micron, seperti Catalog. No. F 9643.

- Counterstain methylene blue disiapkan dengan menambah 5 ml cairan methylene blue, Catalog No. 180-8 ke dalam 45 ml air terdeionisasi, campur sempurna, setiap akan digunakan harus dalam keadaan segar.
- Fiksasi : Tambahkan 65 ml Acetone dan 8 ml Formaldehyde 37% ke dalam 25 ml Citrate solution, catalog No. 91-5. Simpan dalam lemari es (2-8 °C). Hangatkan sampai mencapai suhu 23-26 °C sebelum digunakan, stabil bila disimpan tertutup dalam lemari es.

Prosedur :

1. Hangatkan bufer fosfat sampai mencapai 37 °C.
2. Segera sebelum fiksasi, tambahkan 1.5 sodium nitrite tablet solution dengan 0.5 cairan Pararosaniline, Catalog No. 180-4, campur hati-hati dengan membolak-balikkan dan biarkan selama 5 menit, kesemuanya lalu ditambah 40 ml fosfat bufer yang telah dihangatkan.
3. Tambahkan 5 ml  $\alpha$ - Naphthyl Butyrate, catalog No. 180-1

4. Campur baik-baik, tuangkan ke dalam Coplin jar. Cairan akan berwarna Amber, terbentuknya presipitasi menandakan reagent telah terdeteriorasi.
5. Fiksasi sediaan selama 10 detik dalam Citrate-Acetone Formaldehyde pada suhu ruangan (23-26 °C), cuci dalam air terdeionisasi selama 45 detik. Jangan biarkan sediaan menjadi kering.
6. Segera setelah pencucian, letakkan sediaan kedalam larutan dari tahap 4 dan inkubasikan selama 1 jam pada 37 °C.

Catatan : bila sediaan tidak dimasukkan kedalam cairan inkubasi setelah fiksasi, harus dibiarkan kering diudara paling cepat 45 menit.

7. Setelah 1 jam angkat sediaan dari Coplin jar dan cuci dengan air ledeng mengalir. Untuk membuang cairan pewarna.
8. Biarkan sediaan kering diudara selama 15 menit.
9. Counterstain 5 menit dengan methylene blue. Cuci dengan air terdeionisasi.

#### **Pengecatan imunositokimia : TdT**

Reagent :

Anti Bodi:

Terminal Deoxynucleotidyl transferase (TdT) SIGMA T 4278

APAAP SIGMA A-2806

Bridging antibodi : MOUSE IgG M 8642

**Buffer :**

Tris Buffer saline tablet SIGMA T 5030 : buat cairan buffer dengan menambahkan isotonic saline sehingga dicapai pH 8.2

**Fiksasi :**

Buat larutan Acetone dan Methanol dengan perbandingan 1 : 1 ditambah Formaldehyde 40% dengan perbandingan Formaldehyde dan cairan Acetone-Methanol = 1 : 20

**Substrate :**

Naphthol AS-MX phosphate (SIGMA N 4875)	2 mg
Dimethylformamide	0.2 ml
Tris buffer 0.1 M, pH 8.2	9.8 ml
Levamisole (1M)	10 $\mu$ L
Fast Red F 4648	10 mg

Prosedur :

Fiksasi :

1. Fiksasi sediaan dengan acetone-methanol-formalin selama 90 detik. Untuk pengecatan TdT harus selama 15 menit pada suhu 4 °C dengan methanol.
2. Segera pindahkan kedalam TBS (jangan sampai sediaan kering pada setiap langkah setelah fiksasi)
3. Biarkan selama 1-5 menit.

Pewarnaan :

Setelah fiksasi dan pencucian, ambil sediaan dari TBS dan buang buffer yang berlebih.

1. Tambahkan TdT SIGMA T 4278 dan inkubasikan dalam kamar lembab selama 30 menit pada suhu ruangan.
2. Cuci selama 1-2 menit dalam TBS.
3. Tambahkan M 8642 (pengenceran 1/25 ) dan inkubasikan dalam kamar lembab selama 30 menit.
4. Cuci selama 1-2 menit dalam TBS
5. Tambahkan APAAP complex (pengenceran 1/25) dan inkubasikan (SIGMA A-2086) selama 30 menit dalam suhu ruangan.
6. Cuci selama 1-2 menit dengan TBS.



Intensitas pewarnaan dapat ditingkatkan dengan mengulangi langkah 3-6, jika dilakukan pengulangan maka waktu inkubasi untuk langkah 3 dan 5 harus dikurangi 10 menit.

7. Tambahkan substrate dan inkubasikan selama 15-20 menit pada suhu ruangan.
8. Cuci dengan TBS dan kemudian air ledeng.
9. Cuonterstain dengan hematoxyllin.

#### G. Prosedur pengambilan dan pengumpulan data :

Data-data dari 3.5.1 diambil dari preparat darah tepi dan sumsum tulang sesegera mungkin agar tidak terdapat perubahan warna karena faktor penyimpanan. Untuk menghindari bias data karena subyektifitas pemeriksa maka setiap preparat dibaca "Duplo" dimana pembaca kedua adalah "supervisor" peneliti.

Preparat disimpan dan dilapisi agar dapat diperiksa penguji utama.

Sedapat mungkin setiap preparat mempunyai data foto berwarna, paling tidak foto untuk tiap kriteria pembacaan.

#### H. Cara atau teknik analisa data.

Pada penelitian ini melakukan observasi terhadap (Bambang Sutrisno, 1991) metode pewarnaan sitokimia dan 1 macam pewarnaan imunositokimia tanpa ada perbedaan perlakuan terhadap subyek .

Analisa data sebagai berikut :

- Deskripsikan diagnosis morfologis sediaan hapus sumsumtulang pada leukemia akut dengan pengecatan Romanowsky & SBB

- Deskripsikan diagnosis morfologis sediaan hapus sumsum tulang pada leukemia akut dengan pengecatan kombinasi Romanowsky + sitokimia + imunositokimia.
- Dipergunakan tabel 2x2 untuk melihat kesesuaian hasil diagnostik morfologik antara pengecatan giemsa & SBB terhadap kombinasi giemsa + sitokimia + imunositokimia . Dicari derajat kesesuaian ( kappa ) dengan tes Mc Nemar untuk dua sampel dependen



## - BAB IV

### HASIL PENELITIAN

Dari hasil penelitian didapatkan 17 penderita leukemia akut dari bagian Penyakit Dalam RSUP Dr. Kariadi serta bagian Anak RSUP Dr. Kariadi Sub Bagian Hematologi, dari RS. ST. Elizabeth, RS. Telogorejo dalam kurun waktu Maret 1997 sampai September 1997.

#### A. Karakteristik penderita :

Setelah pemeriksaan darah rutin didapatkan 5 penderita curiga LNLA, 2 penderita curiga CML dalam krisis blastik dan 10 penderita curiga LLA. Berikut ini digambarkan karakteristik umur dan jenis kelamin dan gambaran pemeriksaan darah rutin dari setiap kelompok.

#### B. Didapatkan 5 penderita curiga LNLA.

1. Umur : termuda 15 tahun dan paling tua 55 tahun didapatkan mean umur 31 tahun dengan SD 15.

Kesan : Banyak terjadi pada usia dewasa.

2. Jenis kelamin : pria : wanita = 2 : 3.

3. Hasil pemeriksaan darah rutin :

- a. didapatkan kadar Hb terendah 2,9 dan kadar Hb tertinggi 10 gr/dl dengan rerata kadar Hb  $6,32 \pm 2,5$  gr/dl

Kesan : penurunan kadar Hb cukup berat.

- b. didapatkan jumlah lekosit terendah  $9,7 \times 10^9/L$  dan terbanyak  $405 \times 10^9/L$  dengan rerata jumlah lekosit  $127,26 \times 10^9/L \pm 162 \times 10^9/L$ .

Kesan : jumlah lekosit sangat bervariasi mulai dari normal sampai  $405 \times 10^9/L$ .

- c. didapatkan jumlah trombosit terendah  $13 \times 10^9/L$  dan tertinggi  $90 \times 10^9/L$

Dengan rerata jumlah trombosit  $40,8 \times 10^9/L \pm 30,441 \times 10^9/L$

Kesan : terdapat penurunan jumlah trombosit dari sedang sampai berat.

4. Hasil pemeriksaan Giemsa dan SBB :

2 penderita merupakan M4

2 penderita merupakan M5

1 penderita merupakan M2

5. Hasil pemeriksaan sitokimia :

- a. SBB: 4 penderita dengan hasil positif

1 penderita dengan hasil negatif

- b. MPO : 4 penderita dengan hasil positif

1 penderita dengan hasil negatif.

c. CLE : seluruh penderita tercatat hasil positif.

d. BUE : 3 penderita dengan hasil positif

2 penderita dengan hasil negatif

e. TdT : tidak satupun positif .

Kesan :

a. Ketiga penderita dengan MPO, SBB, CLE dan BUE positif merupakan M4.

b. Satu penderita dengan MPO, SBB, CLE positif dan BUE negatif termasuk LNLA dan bisa M1, M2, M3, atau M6. Melihat hasil pengecatan giemsa termasuk M2.

c. Satu Penderita dengan hanya CLE positif sedangkan lainnya negatif termasuk AUL (Acute Undifferentiated Leukemia).

### C. Kelompok yang dicurigai CML Dalam Krisis Blastik

Penderita dengan klinis curiga CML dalam krisis Blastik : didapatkan 2 penderita dengan :

1. Umur : 51 dan 67 tahun, dengan rerata  $59 \text{ tahun} \pm 11,3137$  tahun

Kesan pada umur diatas lima puluhan.

2. Jenis kelamin : seluruhnya pria.

### 3. Hasil Pemeriksaan darah rutin :

- a. Didapatkan kadar Hb 7,9 dan 9,3 gr / dl dengan rerata 8,6 gr / dl  $\pm$  0,99 gr/dl.

Kesan : kadar Hb menurun sedang

- b. Didapatkan jumlah leukosit  $75,8 \times 10^9/L$  dan  $2650 \times 10^9/L$  dengan rerata  $1362,9 \times 10^9/L \pm 1820,234 \times 10^9/L$ .

Kesan : Jumlah leukosit meningkat dan variasinya cukup besar.

- c. Didapatkan jumlah trombosit :  $6 \times 10^9/L$  dan  $53,2 \times 10^9/L$  dengan rerata  $29,6 \times 10^9/L \pm 33,375 \times 10^9/L$ .

Kesan : Jumlah trombosit menurun sedang sampai berat.

### 4. Hasil pemeriksaan Sitokimia :

- a. SBB ; tidak ada yang positif.
- b. MPO ; tidak ada yang positif.
- c. CLE : seluruhnya positif.
- d. BUE : seluruhnya negatif.
- e. TdT : dua-duanya positif.

Kesan : CML dalam krisis blastik dengan dominasi sel limfoblast.

#### D. Kelompok dicurigai LLA.

Penderita dengan sediaan hapus Giemsa curiga LLA didapatkan 10 penderita dengan

1. Umur : termuda 2,5 tahun dan tertua 25 tahun dengan rerata  $7,1250 \pm 6,9973$  tahun

Kesan : Terbanyak pada usia muda .

2. Jenis kelamin : perbandingan pria : wanita = 1 : 1.
3. Hasil pemeriksaan darah rutin :
  - a. Kadar Hb : terendah 2,4 gr/dl dan tertinggi 13,8 gr/dl dengan rerata Hb :  $7,7 \text{ gr/dl} \pm 3,563 \text{ gr/dl}$ .

Kesan : kadar Hb bisa didapat normal dan menurun sampai dibawah  
6 gr/dl

- b. Jumlah leukosit : terendah  $6,3 \times 10^9/L$  sampai  $172 \times 10^9/L$  dengan rerata jumlah leukosit  $49,66 \times 10^9/L \pm 50.866 \times 10^9/L$

Kesan : Jumlah leukosit bisa normal sampai meninggi diatas  $150 \times 10^9/L$ .

- c. Jumlah trombosit : terendah  $6 \times 10^9/L$  dan tertinggi  $140 \times 10^9/L$  dengan rerata jumlah trombosit  $53,2 \times 10^9/L \pm 36,5 \times 10^9/L$

Kesan : menurun dari ringan sampai berat.



4. Hasil pemeriksaan sitokimia :

- a. SBB : hanya positif 1 dari 10 penderita (10%).
- b. MPO : hanya positif 1 dari 10 penderita (10%).
- c. CLE : hanya positif 1 dari 10 penderita (10%).
- d. BUE : seluruhnya negatif.
- e. TdT : positif pada 9 dari 10 penderita (90%) 1 negatif (10%) pada penderita dimana hasil MPO, SBB, CLE dan BUE semuanya positif

Kesan : 9 penderita sesuai dengan lekemi limfoblastik akut.

1 Penderita dimana hasil MPO, SBB, CLE positif dan BUE negatif termasuk LNLA.

Tabel 6 : GAMBARAN HEMATOLOGI PENDERITA DAN GAMBARAN SUMSUM TULANG SEBELUM PENGECATAN MPO, CLE, BUE, TdT.

NO	KODE	UMUR	SEX	DARAH RUTIN			GAMBARAN SUMSUM TULANG SEBELUM PENGECATAN MPO, CLE, BUE, TdT	
				Hb	LEKOSIT	TROMBOSIT	JENIS LEUKEMI AKUT DAN SUBTIPENYA	
1	101	25	P	6,4	71,2	28	LNLA	M5
2	102	15	P	10,0	405	13	LNLA	M2
3	103	23	L	6,8	128	24	LNLA	M4
4	104	55	P	5,5	22,4	90	LNLA	M4
5	105	37	L	2,9	9,7	49	AUL	M5
6	201	51	L	9,3	75,8	6	CML KB	LLA
7	202	67	L	7,9	2650	53,2	CML KB	LLA
8	301	6	P	7,8	70	6	LLA	L2
9	302	2,5	P	13,8	66,8	100	LLA	L1
10	303	2,75	P	5,0	6,3	25	LLA	L1
11	304	13	L	6	20,9	23	LLA	L1
12	305	4,5	L	13,3	7,5	23	LLA	L1
13	306	5,5	L	7,4	38,2	140	LLA	L1
14	307	6	P	6,8	80	90	LLA	L1
15	308	3	L	2,4	18,1	21	LLA	L1
16	309	25	P	5,5	172	40	LLA	L2
17	310	3	L	9	16,8	54	LLA	L1

TABEL 7 : HASIL PENELITIAN

NO	KODE	SEX	GIEMSA	SBB	TIPE	SUB TIPE	MPO	CLE	BUE	TdT	TIPE	SUB TIPE
1	101	P	LNLA	+	LNLA	M5	+	+	+	-	LNLA	M4
2	102	P	LNLA	+	LNLA	M2	+	+	-	-	LNLA	M2
3	103	L	LNLA	+	LNLA	M4	+	+	+	-	LNLA	M4
4	104	P	LNLA	+	LNLA	M4	+	+	+	-	LNLA	M4
5	105	L	LNLA	-	LNLA	M5	-	±	-	-	AUL	-
6	201	L	CML KB	-	CML KB	LLA	-	±	-	+	CML KB	LLA
7	202	L	CML KB	-	CML KB	LLA	-	±	-	+	CML KB	LLA
8	301	P	LLA	-	LLA	L2	+	+	-	-	LNLA	M2
9	302	P	LLA	-	LLA	L1	-	-	-	+	LLA	L1
10	303	P	LLA	-	LLA	L1	-	-	-	+	LLA	L1
11	304	L	LLA	-	LLA	L1	-	-	-	+	LLA	L1
12	305	L	LLA	-	LLA	L1	-	-	-	+	LLA	L1
13	306	L	LLA	-	LLA	L1	-	-	-	+	LLA	L1
14	307	P	LLA	-	LLA	L1	-	-	-	+	LLA	L1
15	308	L	LLA	-	LLA	L1	-	-	-	+	LLA	L1
16	309	P	LLA	-	LLA	L2	-	-	-	+	LLA	L1
17	310	L	LLA	-	LLA	L1	-	-	-	+	LLA	L2
											LLA	L1

Keterangan CML KB : CML dalam krisis blastik.



## BAB V

## DISKUSI / PEMBAHASAN

Dari hasil pemeriksaan 17 penderita leukemia akut didapat :

- 5 ( 29,41 % ) dengan sediaan hapus yang di cat konvensional mencurigakan kearah LNLA , dengan rerata umur 31 tahun  $\pm$  15,55 tahun (termuda 15 tahun dan tertua 55 tahun) dengan 3 orang diantaranya wanita (60%) dan 2 pria (40%) seluruhnya dengan Hb kurang dari normal, 4 (80%) dengan lekositosis, 1 (20%) dengan jumlah lekosit dalam batas normal, seluruhnya disertai trombositopeni ( 100 % ). Pada sediaan hapus yang dicat konvensional 2 dari 4 penderita tersebut menunjukkan kriteria M4, sedangkan 1 lainnya memenuhi kriteria M5, ketiga penderita tersebut hasil pengecatan MPO, CLE dan BUE nya positif, hal mana pada kerangka teori sesuai dengan M4. Berarti berdasarkan konfirmasi pengecatan sitokimia penderita dengan cat giemsa dicurigai semula sebagai M5 ternyata merupakan M4. Satu penderita dengan evaluasi pengecatan konvensional merupakan M2 setelah di cat MPO, CLE positif dan BUE negatif sehingga sesuai untuk : LNLA M2. Satu penderita dari 5 penderita tersebut hasil pengecatan konvensional menunjukkan M5 sedangkan MPO, BUE, negatif hanya CLE yang positif itupun trace ( + ) dengan bentuk-bentuk inti yang bizarre dikonfirmasi sebagai leukemia akut tidak terdeferensiasi. Keseluruhan 5 penderita hasil pengecatan TdT nya negatif.

Berarti ada 3 dari 5 ( 60 % ) penderita curiga LNLA yang setelah secara konvensional kemudian pengecatan MPO, CLE, BUE, TdT tidak mengalami perubahan diagnostik morfologik, sedang 2 dari 5 ( 40 % ) penderita curiga LNLA setelah dievaluasi MPO, CLE, BUE, TdT mengalami perubahan diagnostik morfologik . Berdasarkan analisa dengan tes Mc Nemar untuk dua sampel dependent didapat derajat kesesuaian ( Kappa ) : PABAK =0,20 dan BAK 0,20 untuk Giemsa & SBB atau untuk pengecatan MPO, CLE, BUE, TdT PABAK=0,80 dan BAK =0,80, berarti pengecatan konvensional kurang baik dalam menentukan subtype LNLA atau berarti juga pengecatan MPO,CLE, BUE, TdT sangat baik dalam menentukan subtype LNLA.

- 2 penderita (11,76%) dengan rerata umur 59 tahun (51 dan 67 tahun) keseluruhannya pria didapatkan pada pembacaan pengecatan konvensional sesuai CML dalam krisis blastik dengan hasil MPO negatif serta TdT positif berarti sel-sel tidak didominasi sel-sel granuloepoitik dan telah mengalami transformasi limfoblastik. Kedua penderita ternyata CLE positif walaupun trace, hal ini menunjukkan masih cukup terdapat komponen granuloepoitik. Karena jumlah sampel hanya 2 tidak dapat diperiksa derajat kesesuaian ( Kappa ).

- 10 penderita (58,82%) yang didiagnosa LLA secara pengecatan konvensional setelah pengecatan sitokimia & imunositokimia didapat 9 penderita (90,0%) dengan MPO, CLE, BUE negatif, sedangkan TdT positif, Satu penderita (10,0%) dengan hasil MPO, CLE, positif dan BUE negatif serta TdT negatif

berarti sesuai dengan LNLA. Dan diobati sebagai Leukemi Mieloblastik Akut. Setelah dinilai derajat kesesuaian ( kappa ) didapat nilai PABAK 0,80 dan nilai BAK 0,80 .Berarti pengecatan konvensional sangat baik menentukan LLA terhadap pengecatan MPO, CLE, BUE, TdT.

- Jadi dari hasil pengecatan konvensional didapat 5 LNLA , 10 LLA dan 2 CML dalam krisis blastik.
- Sedangkan pengecatan MPO,CLE,BUE, TdT didapat 6 LNLA, 9 LLA dan 2 CML krisis blastik dengan predominan limfoblastik.

Setelah dilakukan tes Mc Nemar untuk dua sampel dependent terhadap hasil pengecatan konvensional untuk LNLA dan LLA dibandingkan pengecatan MPO,CLE, BUE, TdT untuk LNLA dan LLA didapat derajat kesesuaian ( Kappa ) : PABAK = 0,87 dan BAK = 0,86 berarti pemeriksaan konvensional sangat baik menentukan apakah leukemia akut termasuk LNLA ataupun LLA.





## BAB VI

### KESIMPULAN DAN SARAN

#### A. Kesimpulan :

1. Pengecatan MPO, CLE, BUE, TdT dapat digunakan untuk menentukan subtype LNLA secara akurat, karena sangat baik menentukan subtype LNLA dibandingkan pengecatan Giemsa & SBB ( PABAK =0,80 dan BAK = 0,80 ).
2. Masih terdapat lekemi akut yang tidak terdeferensiasi walaupun dilakukan pengecatan MPO, CLE, BUE, TdT ( 1 dari 17 penderita =5,8 % )
3. Pengecatan giemsa & SBB kurang baik untuk menentukan subtype LNLA ( PABAK=0,20 dan BAK =0,20 )
4. Pengecatan giemsa & SBB sangat baik untuk menentukan lekemi akut termasuk LNLA atau LLA (PABAK=0,87 dan BAK =0,86 )

#### B. Saran

- Pengecatan Giemsa & SBB saja kini tidak cukup perlu disertai pengecatan kombinasi MPO, CLE, BUE, TdT.
- Pengecatan MPO, CLE, BUE, TdT sebaiknya dilakukan secara rutin untuk menentukan diagnosis lebih akurat.



## DAFTAR PUSTAKA

- AP Pradana. Pemeriksaan Penunjang Pada Keganasan Hematologik. Dalam Soenarto, AG Soemantri, C. Suharti. Simposium Deteksi Dini Dan Pengelolaan Keganasan Hematologik .Semarang: Badan Penerbit Undip, 1995; 95.
- Bambang – Sutrisno. Peranan Pengecatan Sitokimia pada Diagnosis Leukemi Akut. Dibawakan pada Konas I PDS PATKILN. Jakarta, 9 –10 Desember 1991.
- Bain BJ. Leukemia Diagnosis A Guide to The FAB Clasification. Philadelphia : Gower Medical Publising, 1990 ; 1-41.
- Brown B. Special Hematology Procedures. In Hematology : Principles and Procedures. 2<sup>nd</sup> ed. Philadelphia : Lea & Febiger, 1976 ;p 179 –81
- Catovsky.D. Leucocyte cytochemical and imunological technique. In Dacie J, Lewis S. Practical Haematology. 8<sup>th</sup> ed. Edinburgh : Churchil Livingstone, 1995 ; 143 – 57.
- Djulgovic B. Reasoning and Decision Making In Hematology. 1<sup>st</sup> ed. New York : Churchill Livingstone, 1992 ; 101, 107, 125. .
- Henderson ES. Acute Leukemia in Adults. In Hoogstraten B, ed. Hematologic Malignancies. Berlin : Springer – Verlag, 1986 ; 18.
- Lanzkowsky P. Pediatric Hematology Oncology. New York : Mc. Graw – Hill Book Co. 1980 ; 319.

**Latiyani – Djamil.** Gambaran Hematologik Leukemi Akut Pada Orang Dewasa di RS. Dr. Kariadi selama tahun 1987 – 1988. Suatu Penelitian Karya Akhir. Semarang : Laboratorium Patologi Klinik Fakultas Universitas Diponegoro Instalasi Laboratorium Sentral RS. Dr. Kariadi, 1990 ; 5.

**Latiyani – Jamil.** Pembacaan preparat darah tepi leukemia pada waktu Workshop Hematologi III. Semarang 10 Juni 1995 : Bagian Patologi Klinik Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro / R.S. Dr. Kariadi 1995 ; 37-9.

**Lukens J.** Classification and Differentiation of The Acute Leukemias. In Lee R. Bithel T. Foerster J, Athens J, ed. Wintrobe's Clinical Hematology. Vol 2. 9<sup>th</sup> ed. Philadelphia : Lea & Febiger, 1993; 1873 – 78.

**Mason DY, Erber WN.** Immunocytochemical Labeling of Leukemia Samples with Monoclonal Antibodies by the APAAP Procedure. In Catovsky D. The Leukemic Cell. 2<sup>nd</sup> ed. Edinburgh : Churchill Livingstone, 1991 ; 38.

**Mc Glave PB.** Acute Leukemia in Adults. In Mazza J. Manual of Clinical Hematology. 1<sup>st</sup> ed. Boston : Little, Brown and Company, 1988 ; 171, 179, 187 – 9.

**Niemeyer CM, Sallan SE.** Acute Lymphoblastic Leukemia. In Nathan and Oski. Hematology of Infancy and Childhood. Vol. 2. 4<sup>th</sup> ed. Philadelphia W.B. Saunders Company, 1993 ; 1250 – 51.

- Rothstein G. Origin and Development of the Blood and Blood Forming Tissues. In Lee R, Bithell T, Foerster J, Athens J, Lukens J, ed. Wintrobe's Clinical Hematology Vol. 1. 9<sup>th</sup> ed. Philadelphia ; Lea & Febiger, 1993 ; 74.
- Soebandiri. Pandangan Baru Tentang Diagnostik dan Terapi Leukemia Akut. Pendidikan Kedokteran Berkelanjutan II Surabaya : Lab. Upf. Ilmu Penyakit Dalam FK. Unair - RS. Dr. Sutomo, Juli 1988 ; 5 - 20.
- Soemantri AG. Hubungan Anemi Kekurangan Zat Besi Dengan Konsentrasi dan Prestasi Belajar. Desertasi Tesis. Semarang : Universitas Diponegoro, 1978 ; 64 - 5, 73.
- Sullivan AK. Classification, Pathogenesis, and Etiology of Neoplastic Diseases of The Haematopoietic System. In Lee R, Bithell T, Foerster J, Athens J, Lukens J ed. Wintrobe's Clinical Hematology. Vol. 2. 9<sup>th</sup> ed. Philadelphia : Lea & Febiger, 1993 ; 1725 - 26.
- Wirawan R. Kosasih A. Setiabudi R. Diagnosis Leukemia Akut, Morfologi dan Sitokimia. Dalam Perhimpunan Hematologi Dan Transfusi Darah Indonesia. Darah. Vol. 2. Jakarta : PT. Nuh Jaya, 1993 ; 7 - 15.