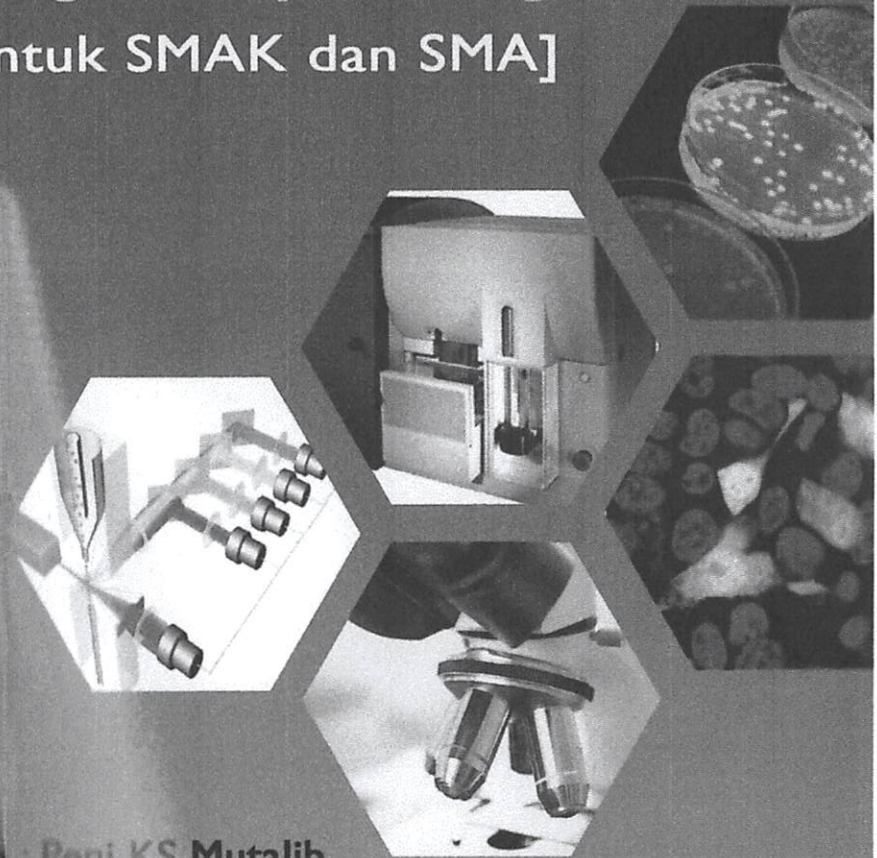


Flowsitometer

Mikroskop Fluoresensi
dengan Obyek Bergerak
[untuk SMAK dan SMA]



Oleh : Peni KS Mutalib

Editor : Indranila Kustarini S

Masrifan Djamil

ISBN 978-602-5560-76-7



9

786025

560767



Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro Semarang

2

Flowsitometer Mikroskop Fluoresensi dengan Obyek Bergerak

[untuk Siswa SMA]

Disusun oleh :

Peni KS Mutalib

Editor :

Indranila Kustarini S

Masrifan Djamil

**FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS DIPONEGORO SEMARANG**

Fluorescence Flow Cytometry
Mikroskop Fluoresensi dengan Obyek Bergerak
[untuk Siswa SMA]

Disusun oleh :
Peni KS Mutalib

Editor :
Indranila Kustarini S
Masrifan Djamil

Pertamakali diterbitkan oleh :
Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro Semarang

Cetakan I : 2018

ISBN 978-602-5560-76-7

Hak cipta dilindungi oleh Undang-undang

Dilarang memperbanyak, mencetak dan menerbitkan sebagian atau seluruh isi buku ini dengan cara dan dalam bentuk apapun tanpa seijin editor dan penerbit.

KATA PENGANTAR

Fluorescence flow cytometry adalah mikroskop fluoresensi dengan obyek bergerak. Obyek bergerak dialirkan melalui nozzle dengan diameter 1 mm, dan obyek berfluoresensi ini ditembak dengan sinar laser biru/hijau sehingga dapat berpendar sinar dengan gelombang cahaya yang lebih panjang hijau/merah. Pendaran ditangkap dan dianalisis dengan 'software' tertentu sehingga dapat ditentukan sel apa, bentuk, ukuran, serta jumlahnya. Fluoresensi sel atau subsel (organel) dapat terjadi secara ekstrinsik yang artinya dilakukan persiapan terlebih dahulu dengan pewarna-pewarna fluoresensi. Fluoresensi intrinsik dapat ditemukan pada kloroplast daun, phytoplankton dan tidak membutuhkan preparasi pewarnaan.

Seperti halnya permainan sepak bola dengan komponen fisik terlengkap (kekuatan, kecepatan, kelincahan, keluesan, daya tahan, keseimbangan, kardiovaskular, power, kerjasama, dll.), fluorescence flow cytometry juga memiliki komponen dasar fisika yang terlengkap: mekanika, matematika, fluida, gelombang cahaya, suhu dan kalor, listrik, medan magnet, optik, hukum termodinamika, gelombang elektromagnetik, relativitas dll. Dengan demikian, fluorescence flow cytometry dikatakan mewakili instrumentasi terlengkap untuk belajar fisika dan sebaliknya merepresentasikan instrumen biofisika masa kini. Buku ini dibuat agar siswa SMA dapat memahami bahwa bahan dasar fisika yang dipelajari memiliki terapan pada satu alat saja yang disebut fluorescence flow cytometry, diaplikasikan di banyak negara, juga Indonesia. Untuk pertama kali, fluorescence flow cytometry di Indonesia, dipakai sebagai pelayanan masyarakat dalam pertahanan terhadap HIV, dalam hal ini penghitung CD3, CD4, CD8 diperiksa dengan fluorescence flow cytometry. Selamat belajar.

PS: Kedatangan kapal riset Perancis dilaporkan detik.com 25 September 2017 URL: <https://news.detik.com/berita/d-3656345/kapal-riset-megah-dari-prancis-mampir-ke-jakarta> dan 21 Desember 2015: <https://news.detik.com/berita/3100931/baru-datang-dari-prancis-ini-kapal-canggih-milik-tni-al-untuk-survei-bawah-laut>

Yang paling mengesankan di kapal riset Perancis 2017 adalah ruang sampel air yang memeriksa phytoplankton di kedalaman laut hingga 6000 m. Catatan penulis langsung teringat Dubelaar, peneliti phytoplankton di North-Sea, dengan cytosubnya datang ke Indonesia 2005, atas undangan departemen Fisika Kedokteran. Search cytobuoy dan cytosence, flowsitometer yang digunakan di laut dalam, laut lepas (*offshore*) dan laboratorium (*onshore*) diberinya nama cytosub. Semuanya dapat dipantau *onshore* dengan menggunakan gelombang radio.

Penulis

DAFTAR ISI

Kata Pengantar	iii
Daftar Isi	v
Daftar Gambar	vi
Glossary	x
Bab I. Mikroskop dan Macamnya	1
Bab II. Ukuran	14
Bab III. Dasar-dasar Mikroskop: Struktur dan Fungsi ...	20
Bab IV. Teori Optik untuk Mikroskop: Lensa dan bintik api (F)	27
Bab V. Apa yang Dapat Dikerjakan flowsitometer	32
Bab VI. Tipe-tipe Flowsitometer	37
Bab VII. Pewarna Fluoresensi dan Seri Balmer	40
Bab VIII. Warna Pelangi Fluoresensi Roger Tsien Menggunakan Gen Warna Koral	42
Bab XI. Hasil Gambar Sel dengan Flowsitometer	44
Bab X. Struktur dan Fungsi Flowsitometer	48
Bab XI. Aplikasi Pertama Flowsitometer di Indonesia ...	51
Bab XII. Aplikasi untuk Penelitian, Pemantauan dan Penentuan Diagnosis	59
Bab XIII. Penutup: Biosafety Containment Testing 12/18/16 Interdisciplin Flowcytometer	62

DAFTAR GAMBAR

- Gambar 1.1.** : Sebuah berita dari Majalah Tempo, 2003
- Gambar 1.2.a.** : Prinsip kristalografi sinar-X menggunakan hukum Bragg
- Gambar 1.2.b.** : Ilustrasi difraksi Sinar-X pada XRD
- Gambar 1.3.** : Flowsitometer portable dan laut lepas serta laut dalam, 2005
- Gambar 1.4.** : Prinsip Flowsitometer
- Gambar 1.5.** : Rekonstruksi profil scan dari info per data bit ratio dengan software Cytoclus
- Gambar 1.6.** : Sel-sel yang sama berkelompok dan dapat dihitung dengan menggunakan Sideways
- Gambar 1.7.** : Software Cytoclus dapat menggunakan 5 sinyal dan 6 parameter yang dapat ditambah sesuai permintaan.
- Gambar 1.8.** : Membuat sinar laser (monokromatik) dengan panjang gelombang yang sama
- Gambar 1.9.** : Selain bentuk, subdivisi lain dapat dikenali oleh klasifikasi kepustakaan dalam CytoClus
- Gambar 1.10.** : (a) Prinsip Dasar Mikroskop Interferensi.
(b) Mikroskop Fase Kontras.
- Gambar 2.1.** : Ukuran Q_{dot} nanokristal, pewarna dengan gelombang emisi tertentu dibandingkan ukuran sel hewan, virus, hingga atom.
- Gambar 2.2.a.** : Ukuran panjang gelombang cahaya tampak: 400-700 MHz (400-700 nm)
- Gambar 2.2.b.** : Gambar panjang gelombang cahaya tampak: 400-700 nm
- Gambar 3.1.** : Struktur mikroskop
- Gambar 3.2.** : Sebuah mikroskop fungsional
- Gambar 3.3.** : Bagian flow yang mengalirkan sel terwarnai satu per satu dan siap tembak
- Gambar 3.4.** : Bagian berkas optik dengan 4 sumber sinar laser Biru, Hijau, Kuning, Merah
- Gambar 3.5.** : Sampel yang telah dipersiapkan dan diwarnai dengan pewarna fluoresens
- Gambar 3.6.** : Bagian magnetik yang berfungsi sebagai sorter
- Gambar 4.1.** : Obyek diluar F1, memiliki gambar riil dan gambar maya tergantung letak objek di dalam atau diluar F
- Gambar 4.2.a.** : Obyek diletakkan diluar 2F2: gambar nyata, tebalik, lebih kecil
- Gambar 4.2.b.** : Obyek diletakkan tepat diluar F1 atau F2: gambar nyata, terbalik, ukuran sama
- Gambar 4.3.** : Obyek diletakkan sedikit diluar F1: gambar nyata, terbalik, lebih besar
- Gambar 4.4.** : Lensa pembesar: Obyek diletakkan di dalam F1: Gambar maya, tegak, lebih besar.
- Gambar 4.5.** : Bayangan lensa I merupakan benda bagi lensa II
- Gambar 7.1.** : Garis Paschen, Balmer dan Lyman pada seri spektrum hidrogen.
- Gambar 8.1.** : *Petri disc* dengan koloni bakteri yang diwarnai Fluoresensi
- Gambar 8.2.** : Pewarna fluoresense tidak selalu hanya satu warna, tapi terdapat beberapa jenis warna seperti yang tampak pada gambar.
- Gambar 9.1.** : Optical scan bentuk spermatozoon dengan Cytosence dan software Cytocluse
- Gambar 9.2.** : Bentuk spermatozoa hasil analisis cytoocluse
- Gambar 9.3.** : Spermatozoa hasil pewarnaan dengan MTG Mito Tracker Green dibaca dengan mikroskop fluoresensi

- Gambar 9.4.** : Scan Optik rekonstruksi dengan 'software' yang dapat tampak di LCD serta dicetak pada kertas.
- Gambar 10.1.** : Perangkat dalam flow dan optik sebuah flowsitometer
- Gambar 10.2.** : Bagaimana media cairan dipompakan dan sinar laser ditembakkan.
- Gambar 10.3.** : Perangkat Flow membutuhkan banyak media cair untuk mengalirkan jasad renik atau sel darah melalui nozzle.
- Gambar 10.4.** : Komponen elektronik sebuah flowsitometer
- Gambar 10.5.** : Petugas membaca hasil analisis detektor Emisi sel-sel yang telah diwarnai.
- Gambar 10.6.** : Air, pompa air, penampung air limbah; nozzle, 4-6 sinar laser, sensor or detektor pembaca sinar yang diemisikan; Unit penganalisis data.
- Gambar 10.7.** : Flow: pompa, media cairan (air) untuk pembersih; Cyto: nozzle dan sumber cahaya sinar laser; serta meter: hardware and software, LCD and printer.
- Gambar 10.8.** : Menjaga rheology nozzle dan aliran air/pompa air, penampung limbah menjadi problem maintenance yang utama.
- Gambar 10.9.** : Air dan pompa air bersih, penampung air limbah; nozzle, sumber laser (eksitasi), detector sinar emisi: Analisis data terscan, rekonstruksi.
- Gambar 10.10.** : Abstrak 191/P89 di Hungaria XXIV World Congress of ISAC tentang berbagi pemakaian Flowsitometer untuk semua disiplin diluar penyakit infeksi HIV, Hepatitis dan sebagainya.
- Gambar 11.1.** : Subpopulasi-subpopulasi berdasarkan FSC vs. SSC: Limfosit-limfosit, Monosit-monosit, Neutropil-neutropil.

- Gambar 11.2.** : X: Emisi CD8/FITC dan Y: CD4R-PE
- Gambar 11.3.** : X: Emisi CD3-FITC, Y: Emisi CD4-PE
- Gambar 11.4.** : X: CD8 dan Y CD4, tampak lokasi sel-sel tersebut
- Gambar 11.5.** : A. Tak ada sel dengan marker CD4/CD8;
B. Banyak Cel CD4/CD8positive
- Gambar 11.6.** : a. CD4-PE: 36,94% b. CD8-FITC 40.18%
- Gambar 11.7.** : CD4-PE 46,20% dan CD8-FITC 31,52%
- Gambar 11.8.** : CD8: PN (positive, negative) CD4 (NP; CD4/CD8 + di kotak kanan atas DP (Double Positive) dan DN (Double Negative).
- Gambar 11.9** : CD4/CD8 DN
- Gambar 11.10.** : CD4/CD8 DN

GLOSSARY (SENARAI)

A

Amplifier : Komponen elektronik dari flowsitometer (sitometer aliran) yang meningkatkan sinyal dengan faktor yang dapat disesuaikan.

Aneuploid : Memiliki jumlah kromosom yang tidak normal. Sel-sel aneuploid mungkin juga memiliki kandungan DNA yang tidak normal.

Apoptosis : Kematian sel terprogram melalui berbagai jalur biologis yang diatur secara ketat.

B

Back gating : Control gating yang berguna untuk memastikan Anda telah mengidentifikasi populasi sel yang tepat menggunakan gating tradisional.

Band pass filter : Filter pass band - memungkinkan cahaya menembus dalam kisaran sempit yang ditentukan

C

Cell sorting : Sortasi sel - kemampuan untuk memisahkan sel, diidentifikasi oleh karakteristik tertentu, di dalam tetesan menggunakan muatan listrik

Channel : Saluran - Nilai yang terukur dari suatu parameter, mempresentasikan intensitas sinyal suatu peristiwa setelah amplifikasi. Untuk tampil pada sebuah plot data dari sebuah peristiwa harus jatuh pada satu dari 256 saluran (0-255) atau salah satu dari 1024 saluran (0-1023) tergantung dari resolusi plotnya.

Compensation : Perhitungan elektronik yang menghilangkan sinyal tumpang tindih yang tidak dapat dihapus oleh sistim optik.

Cursor : Sebuah sorotan yang muncul pada bidang data yang menunjukkan anda bisa memodifikasi bidang ini pada plot titik (dot), crosshair untuk menggambar gerbang

polygon pada histogram. Garis yang memisahkan wilayah pada histogram parameter tunggal yang diperlakukan secara statistik terpisah.

CV % : Persen koefisien variasi adalah ukuran distribusi puncak. Koefisien persen variasi adalah standar deviasi dari puncak dibagi dengan jumlah saluran dari puncak, kali 100.

D

Dot plot : Dua grafik data parameter yang digunakan untuk akuisisi dan analisis. Setiap titik pada layar mewakili satu peristiwa yang dianalisis aliran sitometer (flowsitometer)

Doublets : Dua partikel yang saling menempel, dimana flowsitometer mencatat sebagai kejadian yang lebih besar. Partikel juga dapat terjadi pada triplet dan assosiasi yang lebih tinggi.

Drop delay : Jeda waktu-waktu antara interogasi dan titik dimana tetesan putus selama penyortiran.

E

Event : Peristiwa - sebuah unit data yang mewakili satu partikel atau sel. Peristiwa memiliki nilai intensitas relative dan nomor saluran untuk setiap parameter. Setiap partikel yang menghasilkan cukup sinyal ketika melewati laser untuk dicatat sebagai sinyal atau pulsa.

F

Fixation : Fiksasi - crosslinking protein seluler untuk mempertahankan dari pembusukan dan memungkinkan permeabilisasi tanpa kehilangan isi sel dan struktur untuk pewarnaan intraseluler.

Filter : Suatu alat optik yang digunakan untuk mengurangi panjang gelombang atau frekuensi tertentu saat melewati yang lain.

Flowsitometer : Instrument yang memungkinkan pengukuran sifat partikel individual saat mereka melalui laser.

- F**
Fluorophore : Penanda fluoresensi yang menerima energi cahaya pada panjang gelombang tertentu dan memancarkan kembali pada panjang gelombang yang lebih panjang.
- F**
Fluorescence : Sifat molekul untuk menyerap cahaya pada satu gelombang dan memancarkan cahaya pada panjang gelombang yang lebih panjang. Flowsitometer mendeteksi emisi fluoresensi pada sudut 90 derajat terhadap sinar cahaya.
- F**
Forward scatter (FSC) : Sebuah parameter yang mengukur cahaya yang tersebar kurang dari 10 derajat ketika sebuah sel melewati sinar laser, pengukuran FSC terkait dengan ukuran sel.
- G**
Gain : Dapatkan - Sebuah penyesuaian yang memodifikasi tanggapan amplifier. Peningkatan gain meningkatkan pulsa elektronik (dan nilai intensitas fluorescence relative dan nilai saluran) sebagai respons terhadap sinar cahaya.
- G**
Gate : Gerbang-Batas yang mendefinisikan subset atau sub-populasi kejadian. Gates/gerbang ditetapkan dengan menggambarkan batas-batas disekitar himpunan bagian pada plot data (dot plot atau histogram). Gunakan gerbang baik untuk akuisi data atau analisis. Gerbang inklusif hanya memilih peristiwa yang berada di dalam (dan di) batas. Gerbang eksklusif hanya memilih peristiwa yang jatuh di luar batas.
- G**
Gate set : Kumpulan gerbang yang membatasi akuisisi data atau analisis. Setiap parameter hanya dapat digunakan sekali dalam satu set gerbang.
- G**
Gating : Proses menggambar batas gerbang pada dot plot atau histogram dengan tombol panah atau mouse. Juga mengacu pada penerapan gerbang yang disetel ke data.
- H**
Histogram : Sebuah plot data dari satu parameter. Ini

menampilkan nilai intensitas fluoresensi relatif atau nomor saluran pada sumbu x dan jumlah kejadian pada sumbu Y.

- I**
Imunofenotyping : Identifikasi sel dalam suatu populasi melalui pewarnaan dan identifikasi dengan menggunakan marker spesifik.
- I**
Isotype control : Kontrol isotope - antibodi yang dibangkitkan terhadap antigen yang tidak ditemukan pada sel yang dianalisis untuk membantu menentukan pengikatan antibodi spesifik.
- L**
Linear scale : Skala linier. Skala dimana output berbanding lurus dengan input. Ketika kontrol diatur pada Linear, tegangan yang diukur berbanding lurus dengan saluran dimana peristiwa jatuh.
- L**
Linearity : Linearitas : kemampuan flow cytometer untuk mengukur konten DNA secara akurat.
- L**
Live gate : Gate yang melaluinya data dari flowsitometer/komputer parallel interface (antarmuka) yang harus lolos sebelum akuisisi. Setiap data di luar gerbang tidak masuk ke komputer. Analisis : gate digunakan dalam menganalisis data. Data yang berada diluar batas-batas gerbang analisis tetap dalam memori tetapi tidak dimasukkan dalam analisis.
- M**
Maximal emission : Emisi maksimal-panjang gelombang dimana fluorofora memancarkan photon paling banyak.
- M**
Maksimal excitation : Eksitasi maksimal-panjang gelombang dimana fluorofora tereksitasi oleh sebagian besar photon.
- M**
M phase : M fase : siklus sel, mitosis, dimana sel membelah menjadi dua. Ini mendahului G0/G1 dan mengikuti G2. Sel fasa M dan G2 mengandung jumlah DNA dan jumlah

Marker	: kromosom. Sebuah garis yang memisahkan daerah pada histogram parameter tunggal yang di perlakukan secara statistik terpisah.
Model	: Metode matematis dari analisis data DNA.
N	
Nozzle/cuvette	: Sebuah wadah yang menyempit ke arah bawah dari tempat injeksi, dimana kecepatan cairan meningkat dan sampel difokuskan pada satu aliran pada pemfokusan hidrodinamik.
O	
Operator	: Seseorang yang dapat mengoperasikan flow cytometer dan seharusnya menghasilkan data yang disukai peneliti.
P	
Parameter	: Pengukuran intensitas cahaya, baik tersebar atau memancarkan fluoresensi, dari partikel saat melewati sinar laser.
Photodiode	: Fotodiode : perangkat semikonduktor yang digunakan untuk mendeteksi cahaya dan menghasilkan arus listrik. Biasanya digunakan dalam deteksi pencar/forward scatter (FSC).
Photomultiplier	: Sebuah photodetektor dengan tegangan yang dapat diatur, yang menerjemahkan sinyal tabung optik (PTM) menjadi arus listrik. Detektor PMT digunakan untuk parameter SSC dan fluoresensi. Meningkatkan tegangan PMT, meningkatkan sinyal output untuk jumlah cahaya yang diberikan.
Ploidy	: Jumlah kromosom ada di dalam sel. Jumlah DNA dalam sel memberikan indikasi ploidy, tetapi tidak berbanding lurus. Misalnya haploid, diploid dan aneuploidy.
Pulse	: Pulsa : sinyal elektronik yang dihasilkan oleh partikel (sel atau nukleus) dalam

Qdot	: Quantum dot - Titik-titik kuantum adalah semikonduktor nanokristal yang terbuat dari gugus atom buatan. Titik-titik kuantum adalah fluorofor yang menyerap dan memancarkan photon cahaya pada panjang gelombang yang berbeda. Di laboratorium digunakan untuk pemilahan sel yang diaktifkan-fluoresen (FACS) atau mikroskop fluoresen.
R	
Rate	: Jumlah kejadian per detik yang diproses oleh computer
Reference sample	: Sampel referensi : Sampel dari konten DNA yang dikenal dicampur dengan sampel eksperimental untuk emberikan standar internal.
Resolution	: Resolusi-kemampuan untuk memisahkan positif dari populasi negatif.
S	
S phase	: S phase dari siklus sel, sintesis DNA, dimana sel menduplikasi DNA-nya.
Scale	: Skala: jumlah maksimum acara/peristiwa yang ditampilkan untuk saluran dalam histogram. Nomor skala rendah memperbesar data.
Side scatter (SSC)	: Juga disebut 90 derajat scatter atau right angle scatter. Cahaya tersebar pada sudut 90 derajat saat sel melewati sinar laser. Pengukuran ini terkait dengan granularitas internal atau kompleksitas suatu partikel.
Singlet	: Partikel tunggal (sel atau nukleus) yang merupakan cytometer aliran rekaman sebagai satu peristiwa.
Stain index	: Indeks nada/warna - titik dimana ada pemisahan maksimal antara populasi positif dan populasi negatif pada sampel bernoda/berwarna.
Stokes shift	: Perbedaan antara eksitasi maksimal dan panjang gelombang emisi molekul fluoresen.

Threshold	: molekul kovalen digabungkan bersama. Ambang batas. Nomor saluran terendah untuk parameter yang dipilih untuk mana suatu peristiwa dapat direkam. Flowsitometer mengirim ke komputer hanya kejadian di atas ambang batas.
U Unit	: Satuan ukuran, besaran kuantitas yang pasti, ditentukan dan diadopsi oleh konvensi atau oleh hukum, yang digunakan sebagai standar untuk pengukuran kuantitas yang sama.
V Viability dye	: Pewarna yang memungkinkan identifikasi sel mati melalui pengurangan integritas membrane sel.
Width	: Lebar - interval waktu saat pulsa terjadi.

BAB I MIKROSKOP DAN MACAMNYA

Dalam belajar optik geometrik (pantulan, pembiasan), optik fisis (refraksi, difraksi, interferensi, polarisasi, pendaran) dan optik atomik dan subatomik, sering siswa tidak memahami bagaimana F1 dan atau F2 dapat salah tergambar di luar kertas. Juga sifat prinsip dual Broglie dan kegunaan garis spektrum Balmer. Tetapi dengan memahami terapan pada macam mikroskop, seorang siswa akan bersemangat dalam belajar cermin dan lensa, bayangan maya karena semuanya adalah dasar fungsi sebuah mikroskop. Ketika mikroskop ditemukan tahun 1590 berlensa tunggal, sel, kemudian pada tahun 1600 Hans dan Zacharias Jansen mengembangkan berlensa ganda, obyektif dan ocular, keduanya convex. Tahun 1670 Antonie van Leeuwenhoek melihat jasad renik di air. Seketika itu manusia bisa melihat jasad renik. Setelah itu, kita mengenal berbagai mikroskop dengan variasi lensa, tipe sinar dan strukturnya sebagai berikut:^{13,14}

- 1). Mikroskop Interferensi;
- 2). Mikroskop fase kontras;
- 3). Kristalografi Sinar X;
- 4). Mikroskop fluoresensi;
- 5). Mikroskop konfokal;
- 6). Mikroskop electron.

Dengan berkembangnya *software* komputer, detektor tak lagi menggunakan mata melainkan kamera dan gambar atau konstruksi gambar ditampilkan dalam layar LCD komputer.^{7,9}

Mikroskop interferensi, Mikroskop fase kontras, Mikroskop konfokal, Mikroskop sinar LASER, Mikroskop elektron, 2 yang terakhir mempunyai resolusi lebih baik dari mikroskop cahaya tampak karena monokromatik dan panjang gelombang λ lebih kecil dari cahaya tampak. Dua yang pertama menyelesaikan

masalah sel transparan (misalnya bakteri dalam larutan air) dengan menambah kontras.²

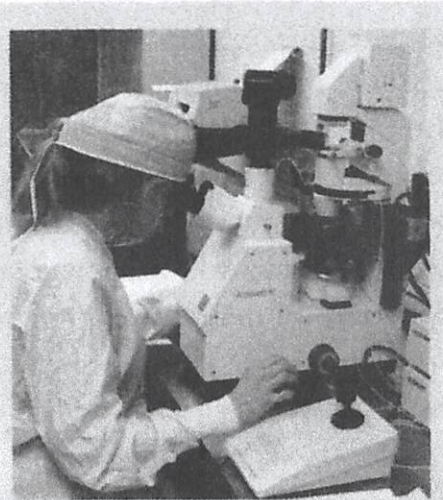
Mikroskop cahaya standar memiliki resolusi 200-300 nm, dibatasi oleh difraksi. Mikroskop STORM beresolusi <20nm. *Stochastic optical reconstruction microscopy* (STORM) memiliki resolusi ultra tinggi, lebih dari 10x mikroskop cahaya konvensional ditemukan oleh Zhuang, 2006 yang diharapkan dapat membuat gambar-gambar molekular sel hidup dalam waktu sesaat dengan meningkatkan resolusi dan kecepatan.³

Mikroskop Optik Tercanggih

KEMAMPUAN mikroskop dari hari ke hari makin canggih. Universitas Rochester, New York, pekan lalu mengumumkan penemuan mikroskop optik generasi baru. Mikroskop yang dibuat bersama oleh Universitas Harvard dan Universitas Cambridge, Amerika Serikat, ini menurut Lukas Novotny, kepala proyek pembuatannya, memiliki resolusi hingga 25 nanometer. Artinya, obyek berskala "nanometer" (sepemiliar meter) akan terlihat jelas dan detail.

Berbeda dengan mikroskop konvensional, mikroskop ini tak memakai cahaya dari luar untuk menerangi obyek. Sebagai gantinya, pancaran sinar laser (dengan panjang gelombang 500 nanometer) menjadi sumber cahaya. "Teknik ini memberikan detail yang jauh lebih jelas," tutur Novotny.

Mikroskop merupakan peranti utama ilmuwan di laboratorium. Alat ini pertama kali dibuat oleh ahli biologi Belanda, Antonie van Leeuwenhoek (1632-1723). Saat itu



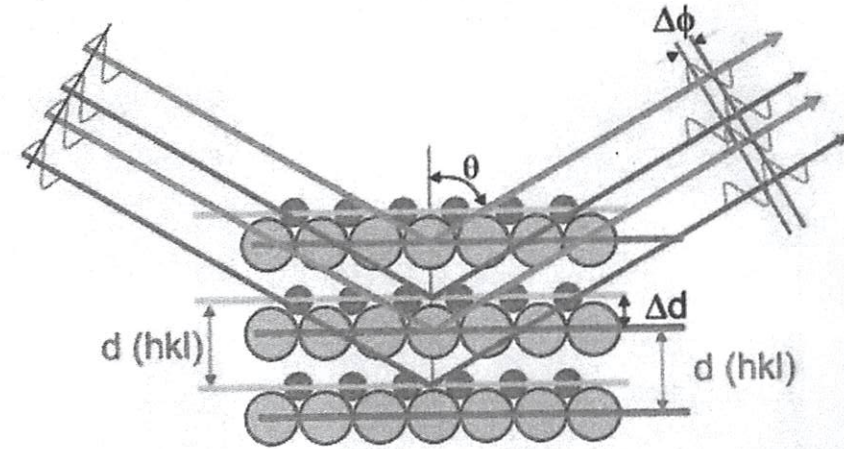
Leeuwenhoek memasang sebuah kaca pembesar pada sebuah tabung metal. Hasilnya, mikroskop sederhana itu mampu memperbesar obyek riset hingga 270 kali. Mikroskop itu pertama kali digunakan untuk "melihat" kehidupan di contoh air dari selokan di Amsterdam, Belanda.

Gambar 1.1. Sebuah berita dari Majalah Tempo, 2003

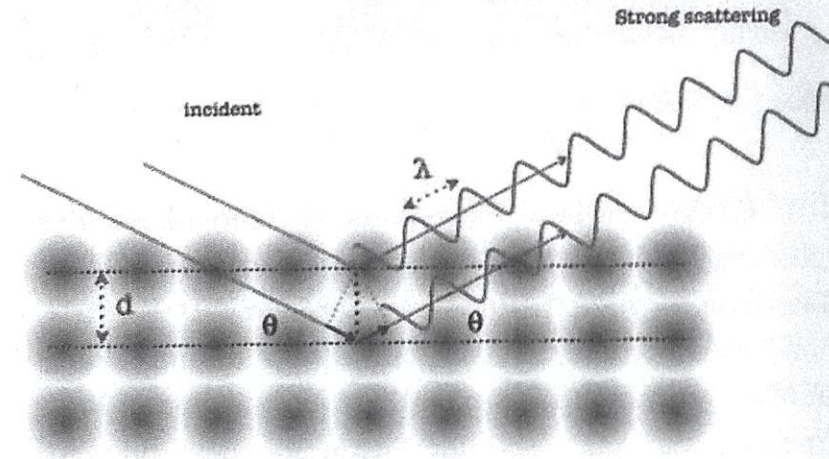
Spektroskopi difraksi Sinar-X merupakan salah satu metoda karakterisasi material yang paling tua dan paling sering digunakan. Kristalografi sinar-X berhasil melihat struktur

double helix DNA tahun 1953 oleh Watson & Crick. Prinsip kristalografi sinar-X menggunakan hukum Bragg: untuk fase-fase dari 2 berkas yang sama (interferensi konstruktif) adalah sebagai berikut:⁵

a.



b.



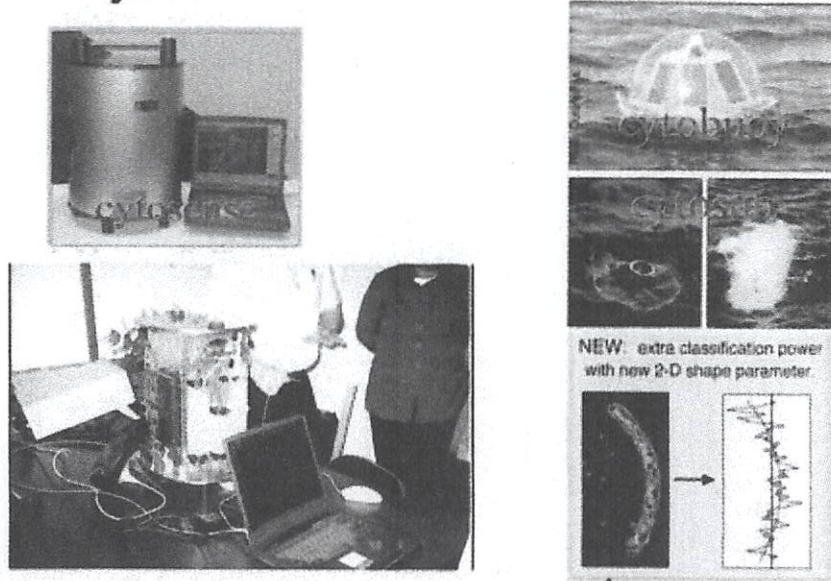
Gambar 1.2a. Prinsip kristalografi sinar-X menggunakan hukum Bragg dari sebuah kumpulan bidang paralel.

Gambar 1.2b. Ilustrasi difraksi Sinar-X pada XRD (*X-Ray diffraction*).

Flowsitometri :

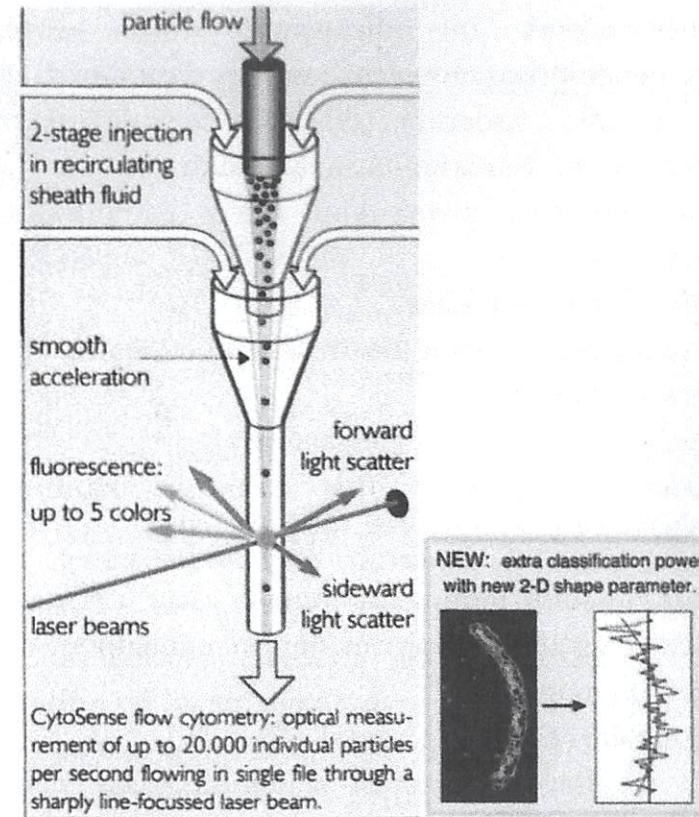
Cytosense hingga FACS Calibur merupakan mikroskop fluoresensi dengan objek bergerak.

Cytosense to FACS Calibur



Gambar1.3. Flowsitometer *portable* dan laut lepas serta laut dalam, 2005

BD FACS Calibur Flowsitometri mengidentifikasi dan menghitung leukosit subsetif pada sel manusia. BD FACS Calibur System adalah flowsitometer dan BD FACS Calibur Stator workstation. FACS Calibur adalah alat yang bermanfaat untuk analisis memiliki dua instrumen laser yaitu 488 (primer) dan 633 (sekunder) yang dapat mendeteksi FSC, SSC, FL-1 (FITC), FL-2 (PE), FL3 (C44, Tricolor) dan FL-4 (APC), Immunophenotyping (CD-4, CD-8), apoptosis (Annekin) Cell Cycle, dan 6FP analisis.⁶



Gambar 1.4. Prinsip Flowsitometer. Ditampilkan atas ijin Dubelaar dari Cytobuoy

Menjadi instrumen yang digunakan dalam banyak aplikasi ilmiah dan praktis, instrumen Cytobuoy telah berkontribusi pada berbagai publikasi selama bertahun-tahun. Bekerja dengan atau memanfaatkan data Cytosense, Cytosub atau pendahulu DPA-Flow cytometer. Cytosense flowcytometri: optical measurement untuk mengontrol instrumen dan untuk menganalisis hasil dari pengukuran flowsitometer, mereka mengembangkan perangkat lunak (*software*) *CytoUsb* dan *Cytoclus*.⁹

Perangkat-perangkat ini dirancang untuk mengontrol instrumen, pengukuran otomatis, analisis data dan klasifikasi. CytoUsb adalah program khusus untuk mengontrol instrumentasi Cyto. Kemampuannya adalah :¹⁰

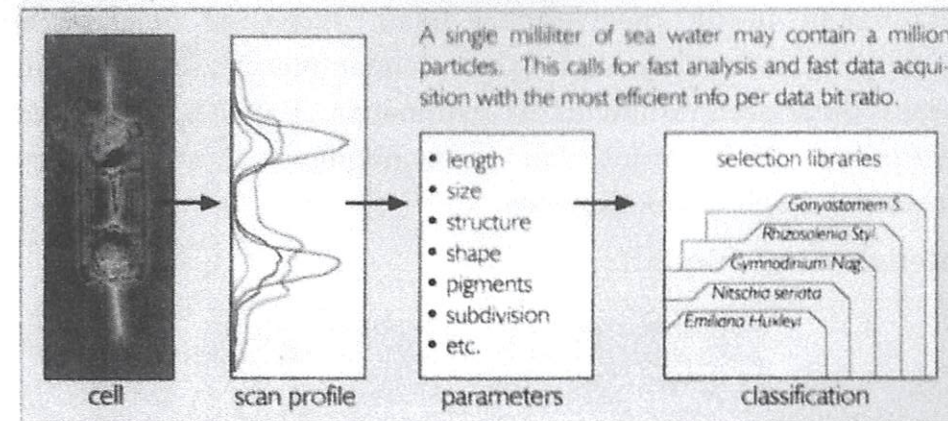
1. Menciptakan dan melakukan skala pengukuran yang berbeda-beda.
2. Visualisasi data *real-time*.
3. Memprogram instrumen untuk kontrol otomatis.
 - Penjadwalan.
 - Respon terhadap pemicu eksternal.
4. Melakukan *instrument fine tuning*, kalibrasi dan pemeriksaan kesehatan.

Cytoclus adalah perangkat lunak yang dirancang dan dikembangkan untuk memproses dan menghasilkan data dari instrumen *Cytobuoy*.

Fungsi utama dari CytoClus adalah :¹²

1. Klasifikasi dan interpretasi sejumlah besar data pulsa partikel dengan gating manual.
2. Menghitung statistik penting dari kumpulan data, misalnya data dari fluoresensi normal atau fluoresensi ukuran partikel rata-rata.
3. Analisa populasi dari waktu ke waktu cocok untuk mendeteksi populasi dari waktu ke waktu. Cocok untuk mendeteksi perubahan rentang dalam budaya atau lingkungan.
4. Penargetan interaktif spesifik untuk pencitraan sampel, memungkinkan identifikasi kluster.
5. Mengekspor data ke format lain untuk analisa data dengan program pihak ketiga lainnya.

Rekonstruksi



Gambar 1.5. Rekonstruksi profil scan dari info per data bit ratio dengan software Cytoclus. Ditampilkan atas izin Dubelaar dari Cytobuoy.

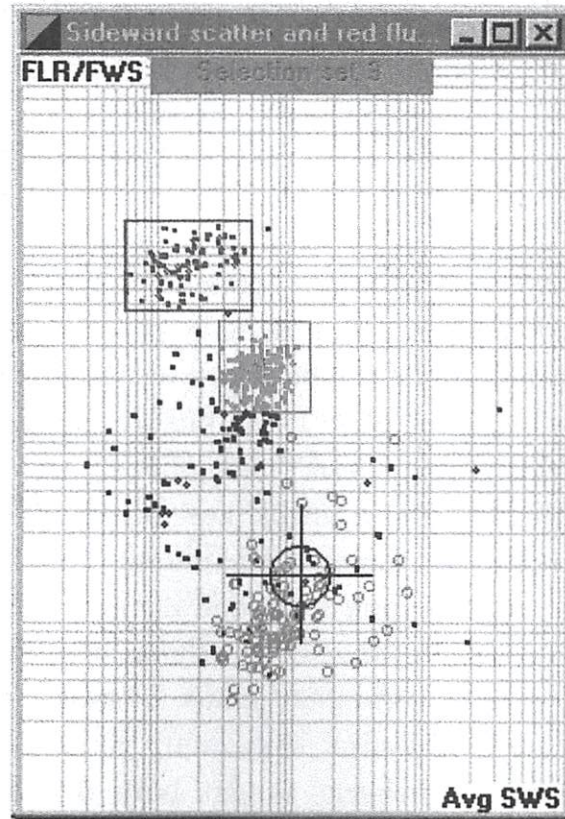
CytoClus berada dibawah perkembangan konstan dan dengan interaksi yang dekat dengan penggunaan fitur-fitur baru dan kemungkinan ditambahkan sangat sedikit.

CytoSense flowcytometri : Pengukuran optik hingga 20.000 partikel individual per detik mengalir dalam satu bagian melalui jalur yang sempit untuk kemudian dikenakan sinar laser. Satu mililiter air dapat mengandung jutaan partikel. Ini membutuhkan analisa yang cepat dan pengumpulan data yang cepat dengan informasi yang efisien per rasio bit data.

EasyClus adalah perangkat lunak otomatis data optimal akhir yang tersedia secara komersial, yang dikembangkan Thomas Rutton. Ini bekerja sangat baik dengan cytometer cytosense dan dimaksimalkan oleh cytobuoy. Ini bekerja dilingkungan Matlab untuk melakukan pengelompokan statistik, *autodate based* dan klasifikasi kluster berdasarkan basis data.







Gambar yang dibuat selama analisis flowsitometri digunakan untuk memvalidasi hasil. EasyClus didasarkan pada pengalaman bertahun-tahun dengan menangani sebagian besar data permintaan akhir cytometric. Banyak penelitian, perbaikan lebih lanjut dan pengembangan algoritma baru telah diperoleh untuk diproses.

Menghitung Jumlah :



Gambar 1.6. Sel-sel yang sama berkelompok dan dapat dihitung dengan menggunakan Sideways.

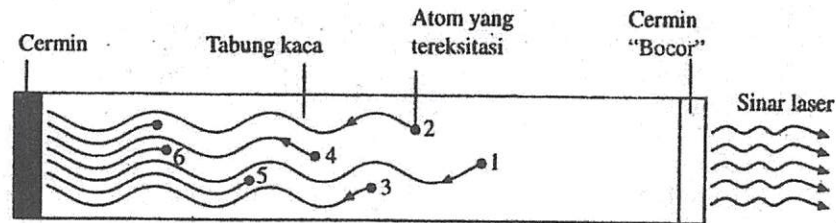
PARAMETERISASI

- | | |
|---|------------------------------|
|  | 1. Panjang Partikel |
| 1- particle length | |
|  | 2. Rata-rata kekuatan sinyal |
| 2- av. signal strength | |
|  | 3. Faktor Pengisi |
| 3- the fill factor | |
|  | 4. Asimetri |
| 4- the asymmetry | |
|  | 5. Inersia |
| 5- the inertia | |
|  | 6. Sejumlah / banyak punuk |
| 6- nr. of "humps" | |

Gambar 1.7. Software Cytoclus dapat menggunakan 5 sinyal dan 6 parameter yang dapat ditambah sesuai permintaan.

Parameterisasi dengan *software* CytoClue menggunakan 5 sinyal dari setiap parameterisasi ke dalam 6 entitas numerikal (2 entitas absolut dan 4 bentuk entitas). Ini berjumlah 30 (5

sinyal x 6 entitas) parameter nilai yang tersedia untuk setiap partikel versi standar CytoClue menggunakan 14 parameter yang paling efisien. Setiap partikel sekarang diwakilkan 14 angka ini dan dapat ditampilkan secara tertulis sebagai titik tunggal dalam plot sebar 14 dimensi. Sebagai gantinya, CytoClue menampilkan setiap partikel dengan tujuh titik : satu titik dalam tujuh plot.⁸



Gambar 1.8. Membuat sinar laser (monokromatik) dengan panjang gelombang yang sama

Macam-macam mikroskop

1. Mikroskop Interferensi:⁹

- Cahaya langsung → koheren (fase sama)
- Bila cahaya melalui bidang dengan $n \neq \text{medium}$ → λ (fase) berubah.
- 4 cermin digunakan untuk mengubah beda fase menjadi beda amplitudo (interferensi) → variabel tebal bidang = variabel kecerahan bayangan.

2. Mikroskop Fase Kontras

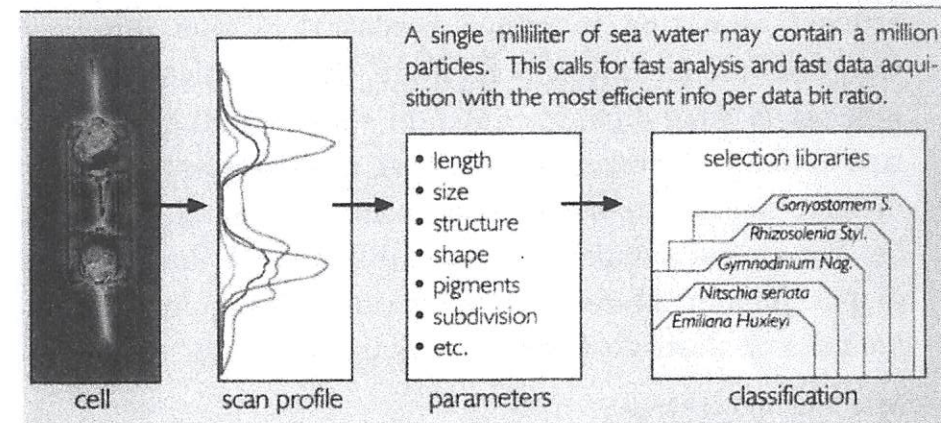
Timbul batasan karena difraksi (halo)³

- Juga menggunakan interferensi dan beda fase.
- 1 pelat dengan lubang berbentuk cincin di atas sumber cahaya digunakan untuk menjatuhkan bidang bayangan sumber pada F lensa obyek (bidang bayangan benda dibelakang F1).

- 1 pelat fase kaca bundar di bidang bayangan sumber (berkas sumber melalui, berkas benda tak dapat melalui) → beda fase.
- Mikroskop interferensi menggunakan 2 cermin $\frac{1}{2}$ perak untuk membagi dan menyatukan sinar.
- Mikroskop fase kontras menggunakan 1 pelat dengan lubang lingkaran dan 1 pelat fase kaca bundar di bidang bayangan sebar.

3. Kristalografi Sinar - X

Merupakan salah satu metoda karakterisasi material yang paling tua dan paling sering digunakan. Mikroskop ini berhasil melihat struktur double helix DN. Prinsip kristalografi sinar-X menggunakan hukum Bragg: untuk fase-fase dari 2 berkas yang sama.⁵



Gambar 1.9. Selain bentuk, subdivisi lain dapat dikenali oleh klasifikasi kepustakaan dalam CytoClus.

4. Mikroskop Fluoresensi

Imaging resolusi nanometer menggunakan mikroskop fluoresensi adalah sentral diantara teknik-teknik eksperimental modern terkini dalam sel biologi dan

molekular. Mikroskop fluoresensi dengan obyek bergerak (flowsitometer) menggunakan sinar laser sebagai sumber, untuk itu karakteristik sinar laser perlu diingat:⁶

- 1) Koheren; 2). Monokromatik; 3). Intensitasnya sangat tinggi; 4). Hanya memiliki satu arah.

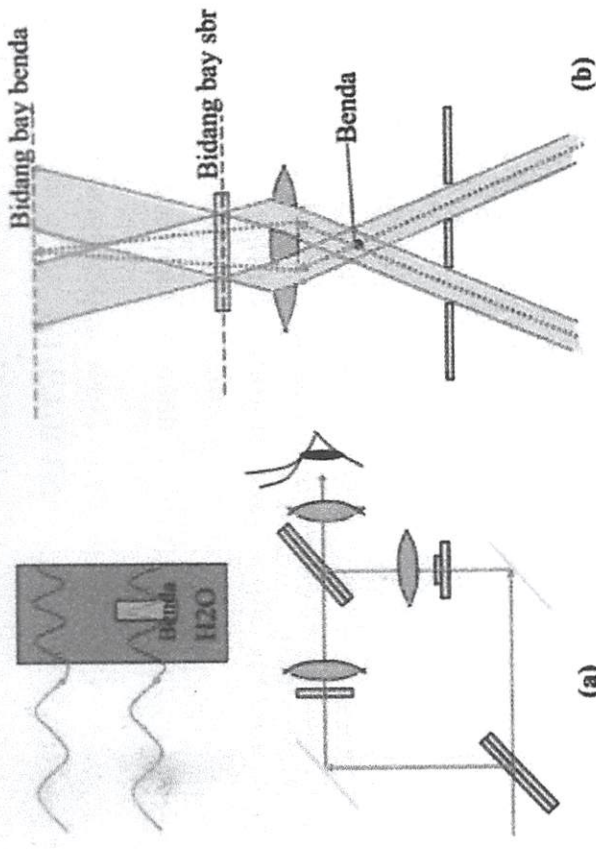
Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation (penguatan cahaya dengan pancaran radiasi karena rangsangan). Desain radiasi emisi dari gelombang koheren dengan intensitas yang sangat tinggi dalam tabung laser.

5. Mikroskop Konfokal

Mikroskop konfokal memiliki resolusi superior - jauh lebih tinggi daripada mikroskop optik konvensional - dan terutama digunakan dalam aplikasi pengukuran. Mikroskop konfokal dapat dikategorikan sebagai tipe refleksi atau tipe transmisi berdasarkan tipe iluminasi yang digunakan untuk pencitraan. Kebanyakan konfokal mikroskop yang digunakan dalam aplikasi industri adalah tipe refleksi. Mereka memberikan gambar resolusi tinggi dengan semua area fokus di seluruh bidang pandang, bahkan untuk sampel yang memiliki penyok dan tonjolan di permukaannya. Mereka memungkinkan pengukuran non-kontak non-destruktif bentuk tiga dimensi.

6. Mikroskop elektron

Mikroskop elektron adalah penyempurnaan dari mikroskop cahaya. Dimana sumber cahaya yang digunakan berasal dari dalam mikroskop itu sendiri. Komponen elektrostatik dan elektrodinamik yang mengatur intensitas cahaya. Selain itu penampakan dengan mikroskop ini menghasilkan pembesaran gambar yang berkali-kali lipat.



Gambar 1.10. (a) Prinsip Dasar Mikroskop Interferensi. (b) Mikroskop Fase Kontras.

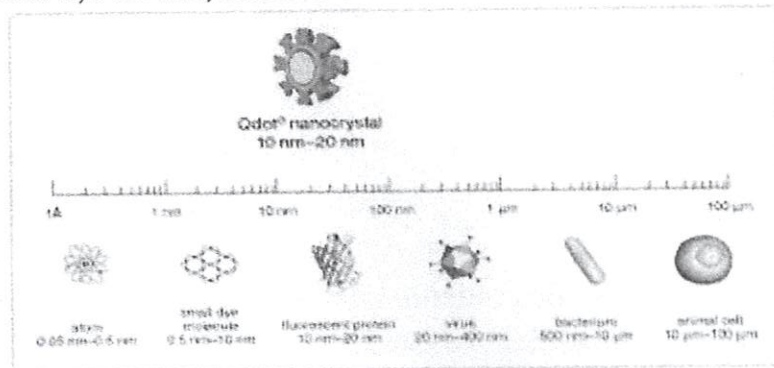
BAB II UKURAN

Dalam matematika konsep ukuran umumnya merujuk pada pengertian seperti "panjang", "luas", dan "volume". Teori ukuran adalah cabang analisis real yang menginvestigasi aljabar. Ukuran pada flowsitometer biasanya adalah: Ukuran obyek, panjang gelombang sinar laser, pewarna *fluorochrome*, dan Q dot nanokristal.

2.1. Ukuran obyek

Obyek dapat berupa sel ataupun subsel (organel) seperti mitokondria, sitoskeleton, ataupun asam nukleat dan protein sinyal.⁹

Sebagai catatan : Sel hewan berukuran 10-100 μm ; Bakteri berukuran 500 nm-10 μm ; Sel darah putih limfosit 6-8 μm ; eosinophil 10-12 μm ; Sel darah merah eritrosit 7-8 μm ; Virus berukuran 20-400 nm; Protein fluorescent 10-20 nm; Molekul pewarna 0,5-10 nm; Atom 0.05-0.5 nm.



Gambar 2.1. Ukuran Qdot nanokristal, pewarna dengan gelombang emisi tertentu dibandingkan ukuran sel hewan, virus, hingga atom.

2.2. Panjang Gelombang Eksitasi dan Emisi (Ex/Em) Sinar Laser¹²

Panjang gelombang emisi Qdot nanokristal tertentu sesuai dengan jenis dan ukuran kristal.

Panjang gelombang sinar laser visual adalah :

Merah 620-750 nm

Jingga 590-620 nm

Kuning 570-590 nm

Hijau 495-570 nm

Biru 450-495 nm

Ungu 380-450 nm

Selain itu, sebagai tambahan kita kenal infra merah (NIR, MIR, FIR) dan ultraviolet UV yang tidak tampak mata telanjang dan tidak digunakan dalam mikroskop.

Panjang gelombang Infra Red 750-1000 nm²²

Panjang gelombang UV :

A 100-290 nm

B 290-320 nm

C 320-380 nm

Sinar laser adalah sinar monokromatik dengan panjang gelombang tertentu untuk sumber eksitasi rangsangan pada objek flowsitometer. Umumnya ada 4-8 sumber sinar laser pada sebuah flowsitometer, minimal biru dan hijau (gelombang pendek) sedangkan detektornya menangkap gelombang cahaya emisi yang lebih rendah (lebih panjang) dari eksitasi sinar laser yang dipakai untuk eksitasi.¹⁸

2.3. Fluorochrome

Pewarna fluoresense membutuhkan sinar laser dengan panjang gelombang tertentu untuk ditembakkan (lebih pendek)

sehingga dapat memberikan sinar emisi yang lebih panjang untuk ditangkap oleh sebuah sensor (detektor).^{12,14}

Berikut adalah panjang gelombang pewarna fluorescent yang dikenal sebagai fluoropore/fluorochrome:^{10,18}

Ex/Em FITC : 488/525 nm [fluorescein]
 Ex/Em PE : 488, 565/575 nm [pycoerythrin]
 Ex/Em APC : 595 645/660 nm [allophycocyanin]
 Ex/Em PerCP : 488/675 nm [peridinin chlorophyll protein complex]

Ex/Em Alexa Fluor 488 : 488/519 nm

Ex/Em Alexa Fluor 700 : 633, 635/715 nm

dan sebagainya.

2.4. Q Dot nanocrystal

Pernah mendengar semikonduktor? Nah kali ini semikonduktor dipakai untuk pewarna dalam Quantum dot nanocrystal dengan ukuran 10-20 nm, yang lebih kecil dari panjang gelombang visual, kurang lebih sebesar ukuran protein. Q dot nanocrystal terdiri dari inti, kerang, dan pelapis. Inti dibuat dari beberapa ratus hingga beberapa ribu atom material semikonduktor (seringkali cadmium dicampur dengan selenium atau tellurium). Kerang khas zinc sulfide, melingkupi semikonduktor dan membuatnya menjadi stabil, meningkatkan sifat optik dan fisik semikonduktor. Semikonduktor dan kerang dilapisi polymer amphiphilic (hidrofobik/hidrofilik).¹¹

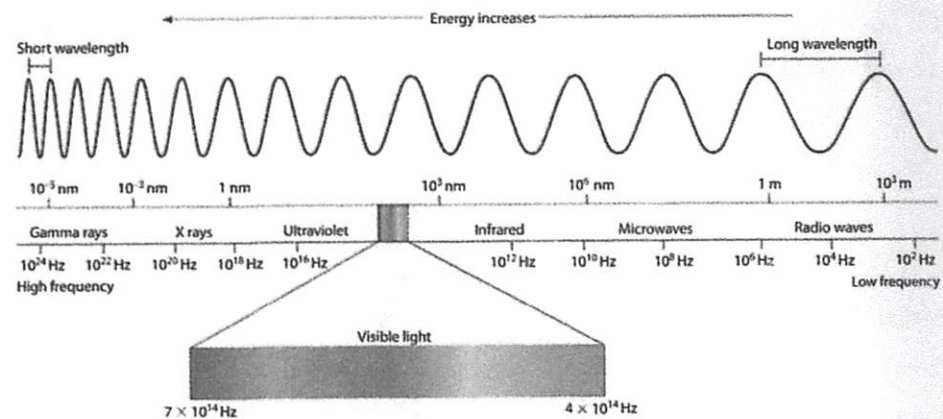
Berbeda dengan fluorochrome di atas yang telah kita kenal, semikonduktor mengabsorpsi fotosinar dan me-reemit kembali sesuai ukurannya yang makin kecil makin tinggi energinya, misalnya molekul emisi biru lebih kecil dari molekul merah.¹⁵

Qdot 525 nanocrystal: 350 nm berukuran 710.000 M-1cm-1;
 488 nm: 130.000 M-1cm-1.

Qdot 800 nanocrystal: 350 nm berukuran 12.600.000 M-1cm-1;
 488 nm: 3.000.000 M-1cm-1; 532 nm: 2.000.000 M-1cm-1.¹²

Struktur Q dot nanocrystal bila dilihat dengan mikroskop elektron, tampak diluarnya diikat pada biomolekul konjugat antibody dalam interferensi akustik. Biomolekul mungkin ditempelkan langsung atau lewat molekul perekat seperti sistem streptavidin-biotin.

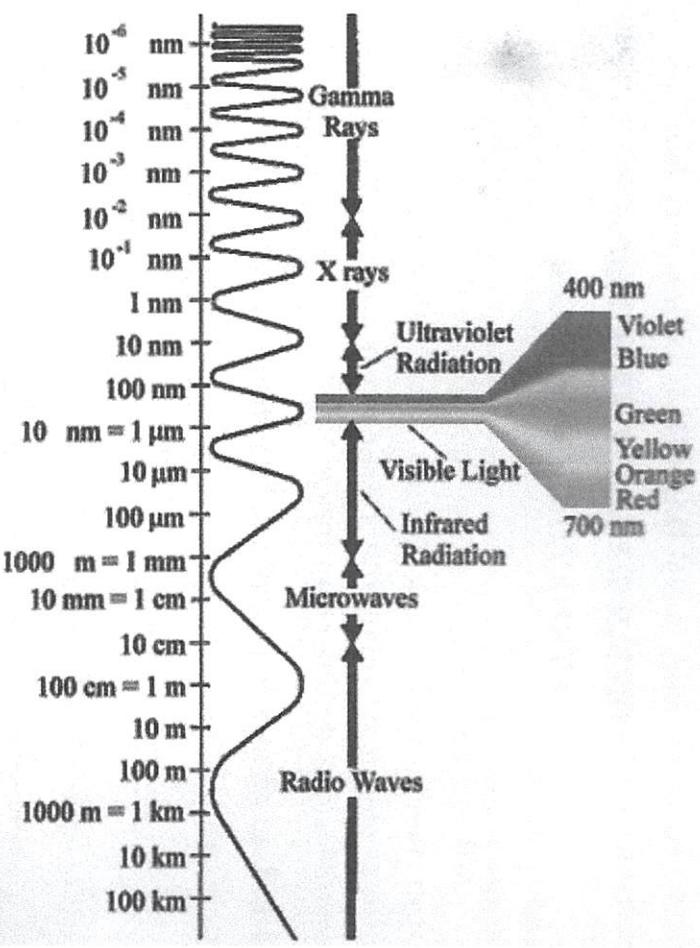
Dapat digunakan CD3 Q dot 655 konjugat dengan streptavidin, IgG Qdot 624 GaM conjugate, IgG Qdot 625 GaH conjugate. Qdot 655 streptavidin atau Qdot 625 GaM memiliki kelebihan yang unik, membuat mereka unggul dalam beberapa kelebihan dibandingkan pewarna molekul organik seperti CD3-FITC, CD4-PE, IgG GaM-Alexa Fluor 488. Berbeda dengan beberapa pewarna organik, bagaimanapun Qdot, tidak dapat menembus membran, sehingga Qdot dapat masuk sel dengan reagen transfeksi seperti peptide translokasi atau liposom kationik, elektroporasi atau mikroinjeksi.¹⁸



Gambar 2.2.a. Ukuran panjang gelombang cahaya tampak: 400-700MHz (400-700 nm)

Prinsip semikonduktor dalam Qdot dapat mudah dipahami sebagai pemancar, dimana berapapun rangsangan, akan memancarkan pada gelombang yang sama sesuai jenis Kristal misalnya germanium dengan ukuran yang ada misalnya 89,6 MHz, gelombang pemancar radio Elshinta. Tercatat Elshinta pertama kali mengudara lewat gelombang AM 1368KHz.¹⁷

Panjang gelombang elektromagnetik sinar gamma, sinar X, sinar tampak (mejiukhibiniu: merah, jingga, kuning, hijau, biru, nila, ungu), gelombang microwaves hingga gelombang radio. Flowsitometer hanya menggunakan sinar visible (sinar tampak). Hafalkan 'range per colour' Dangerous (harmfull) & benefit effects of: UV> 'snow blindness', etc. Meter, dm, cm, m, micrometer (10^{-6}), nanometer (nm: 10^{-9} m), Å (10^{-10} m), picometer (pm: 10^{-12} m), femtometer (fm: 10^{-15} m); attometer (am: 10^{-18} m).¹⁶



Gambar 2.2.b. Gambar panjang gelombang cahaya tampak: 400-700 nm

2.5. Filter dalam sumber cahaya eksitasi.²¹

FACSARIA 4 laser dengan konfigurasi stancart memiliki 4 warna sinar laser.

Penambahan satu sumber ditambahkan pada panel multi-color:

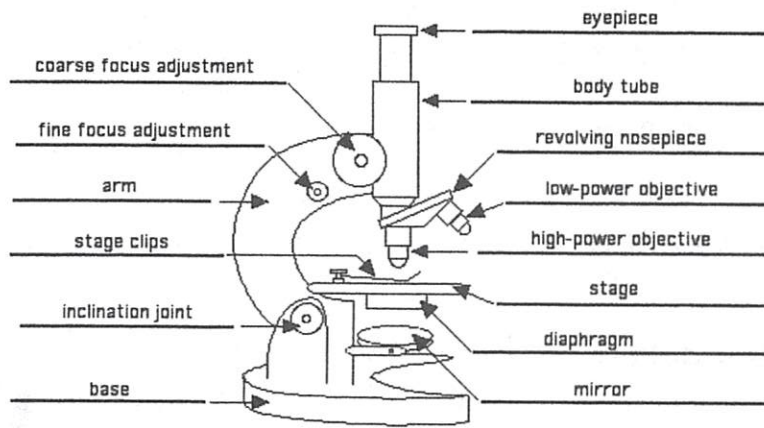
1. Q 525 (530/30 filter, laser ungu)
2. Q 605 (610/20 filter, laser biru)
3. Q 800 (780/60 filter off laser merah atau biru)

Hindarkan Qdot yang memiliki spektrum emisi mirip dengan pewarna yang umum dipakai, seperti Q530 mirip FITC, pilih Q605, Q705 dan Q800, semuanya menggunakan laser 488 nm.

BAB III
DASAR-DASAR MIKROSKOP:
STRUKTUR DAN FUNGSI

Mikroskop merupakan sebuah alat untuk melihat obyek atau benda-benda yang terlalu kecil sehingga tidak dapat dilihat oleh mata telanjang. Dasar-dasar mikroskop antara lain menjelaskan struktur dan fungsi.

3.1. Bagian struktur mikroskop cahaya



Gambar 3.1. Struktur mikroskop

Kiri:

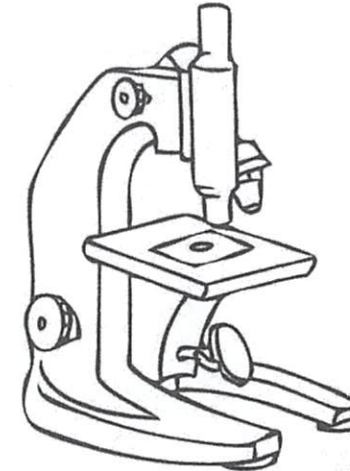
- okuler: 10x, 15x, 20x
- obyektif: 10x, 40x, 100x dan NA 0,45; 0,65
- NA: Numerical Aperture
- penyetel focus kasar
- penyetel focus halus
- lengan
- klip panggung
- sendi pengatur sudut
- dasar yang kokoh

Kanan:

- batang tubuh tabung
- penjuju bagian hidung
- objektif 10, 25, 40x
- panggung
- diafragma
- cermin
- lampu (sumber cahaya)

Mikroskop memiliki tiga sistem lensa, yaitu lensa obyektif, lensa okuler, dan kondensor. Fungsi lensa-lensa tersebut yaitu:¹⁴

- a. Kondensor fungsinya sebagai lensa tambahan yang berfungsi untuk mengumpulkan cahaya yang masuk dalam mikroskop. Letak dari lensa ini yaitu dibawah meja preparat diatas diafragma.
- b. Lensa obyektif fungsinya untuk menentukan bayangan objektif serta memperbesar benda yang diamati. Umumnya ada 3 lensa objektif dengan pembesaran 4x, 10x, dan 40x. Letak dari lensa ini yaitu, dekat dengan benda yang diamati (dekat dengan obyek).
- c. Lensa okuler fungsinya memperbesar benda yang dibentuk oleh lensa okuler. Letak lensa ini yaitu, dekat dengan mata.



Gambar 3.2. Sebuah mikroskop fungsional

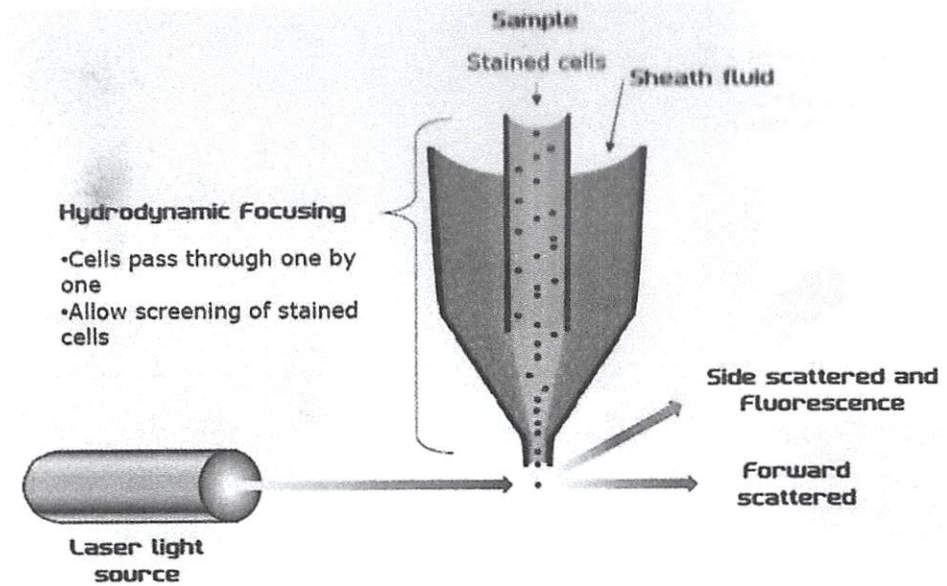
https://img.clipartfest.com/ca5ed9f56513034e17f62dd15a47686a_compound-microscope-drawing-compound-microscope-clipart_1275-1650.jpeg

3.2. Bagian struktur mikroskop fluoresensi dengan objek bergerak (flowsitometer)

Flowsitometer terdiri dari bagian:¹¹

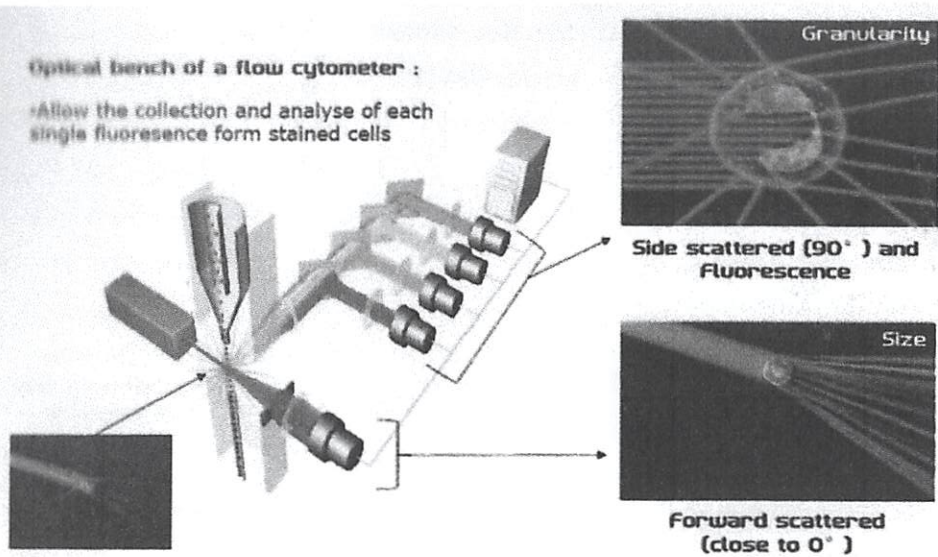
1. Flow: Sel dialirkan satu per satu, fokus pada hidrodinamik mengatur sel-sel terwarnai berkelompok.
2. Cyto: Sampel sel yang telah diwarnai dengan pewarna organik terfluoresensi [atau Kristal nano, atau isotop stabil yang berikatan dengan antibody].
3. Meter: Software menganalisis jumlah kelompok sel, mengukur sel dan mengenali bentuknya.

Perhatikan struktur bagian flow yang memiliki bagian berisi cairan, mengatur aliran sel satu demi satu melalui 'nozzle' mulut pipa. Ketika keluar dari mulut pipa, ditembak oleh sinar laser (excitasi) umumnya UV atau biru 488 nm. Emisi yang dipancarkan ditangkap oleh detektor lurus (*forward scatter*) dan detektor menyamping (*side scattered*). Data yang diterima detektor dianalisis oleh perangkat lunak yang kompatibel dan dapat dibaca serta difokuskan ke sel yang diinginkan, misalnya CD4-PE merepresentasikan limfosit T_H dan CD8-FITC sebagai petanda sel limfosit T_C [cytotoxic] dan T_S [supresor].



Gambar 3.3. Bagian flow yang mengalirkan sel terwarnai satu per satu dan siap ditembak

Tinggi rendah jumlah keduanya serta rasio CD4/CD8 dipakai untuk diagnosis dan prognosis penderita HIV/AIDS. Bagian bangku optik (*optical bench*) sebuah flowsitometer mengatur koleksi dan menganalisis setiap sinar fluoresensi tunggal dari sel-sel terwarnai. *Forward scattered* dengan sudut 0° menggambarkan ukuran sel, sedangkan *side scattered* dengan detektor bersudut 90° dan fluoresensi menggambarkan juga granularitas dalam sitoplasma serta memastikan terjadi fluoresensi merah jingga kuning hijau biru 'mejikuhibi' dari hasil excitasi sumber cahaya UV.²⁰



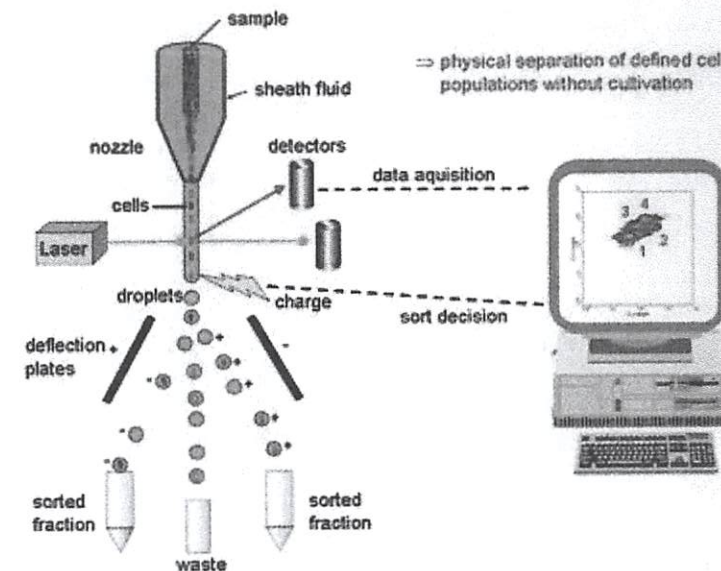
Gambar 3.4. Bagian berkas optik dengan 4 sumber sinar laser Biru, Hijau, Kuning, Merah

Sampel yang telah dipersiapkan misalnya sel darah putih dan diwarnai ini, siap masuk perangkat flow dan dialirkan satu per satu dan dibuat berkelompok oleh fluida kulit. Sewaktu keluar dari mulut nozzle dan masuk pipa, setiap sel ditembak oleh sinar laser umumnya UV dan biru atau hijau. Menurut emisi pewarna fluoresensi organik, pendaran ditangkap oleh detector biru, hijau, kuning, jingga, merah, data dicatat dan dianalisis dengan software. Pemisah sel yang nyata dan disebut proses sorter. Sorter fisis menggunakan kekuatan medan magnet untuk memisahkan fraksi positif dan negatif.²³



Gambar 3.5. Sampel yang telah dipersiapkan dan diwarnai dengan pewarna fluoresens

Titik-titik data setiap sel ditangkap dan diolah dan dianalisis hingga tampil di LCD komputer. Kelompok-kelompok sel dapat dipisahkan dan dihitung jumlah dan ukuran, dan bentuk. Selepas dari pipa tempat penembakan laser, beberapa flowsitometer menambahkan konfigurasi.



Gambar 3.6. Bagian magnetik yang berfungsi sebagai sorter.³²

Bagian magnetik berfungsi sebagai sorter akan memilah dan memisahkan sel-sel, mengidentifikasi serta melalui karakter yang spesifik menggunakan daya listrik.²⁴

BAB IV

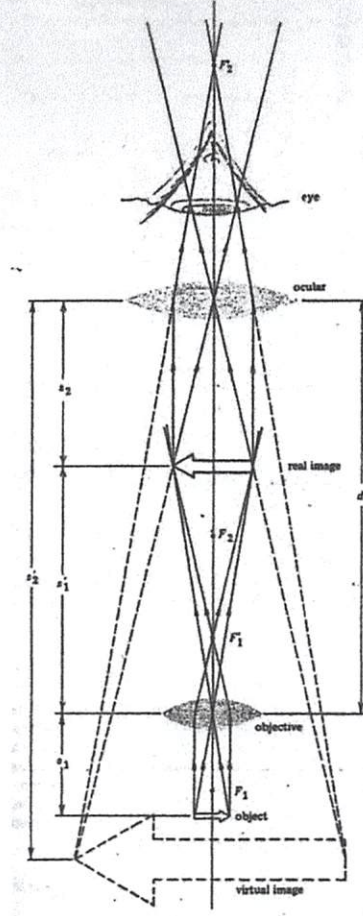
TEORI OPTIK UNTUK MIKROSKOP: LENSA DAN BINTIK API (F)

Sebuah mikroskop fluoresensi terkomputerisasi dengan obyek bergerak: flowsitometer. Mengetahui flowsitometer dan berbagai tipe lain mikroskop kiranya membuat pelajaran optik di SLTA perlu diperkuat.¹¹

Element-elemen essential dari sebuah mikroskop adalah:

- Obyek O, lensa Objective dan Lensa Okular. Object O diletakkan dibelakang fokal poin pertama F dari obyek lensa.
- Lensa objektif, yang membentuk gambar sesungguhnya dan gambar yang diperbesar I. Gambar ini terletak antara F1 dari lensa okular, yang membentuk gambar virtual I pada I. Kami pilihkan lensa dan bintik api (F).
- Lensa okuler, dari posisi I' dapat dimana saja dari titik terjauh dari mata.

Jaras optik (pembesaran) adalah



Gambar 4.1. Obyek diluar F1, memiliki gambar riil dan gambar maya tergantung letak obyek di dalam atau diluar F.

Tiga berkas sinar yang jarasnya siap ditelusuri jejaknya, untuk meletakkan benda sebuah obyek:

1. Cahaya yang paralel terhadap axis \rightarrow melewati focal poin kedua dari lensa-lensa konvergen.
2. Cahaya melalui tengah (*center*) dari lensa \rightarrow tidak terdeviasi.
3. Cahaya melalui (berjalan menembus) titik fokal poin pertama \rightarrow timbul paralel terhadap aksis.

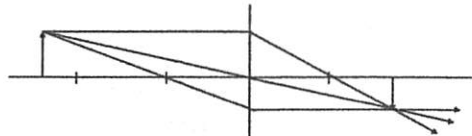
Kesemua cahaya menyempit/menyatu pada satu titik/poin, gambar dari ujung objek, (dua cahaya cukup).

Gambar terbentuk oleh lensa konveks:

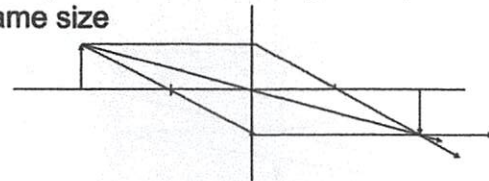
1. Tiga cahaya dengan objek diluar $2F_2$ menghasilkan gambar nyata, terbalik dan lebih kecil.
2. Objek berlokasi pada $2F_2$ yang menghasilkan gambar nyata, terbalik dan dengan ukuran yang sama.

Images formed by convex lens

- 3 rays with object is located outside $2F_2 \rightarrow$ real, inverted, smaller image



- Object is located at $2F_2 \rightarrow$ real, inverted, same size

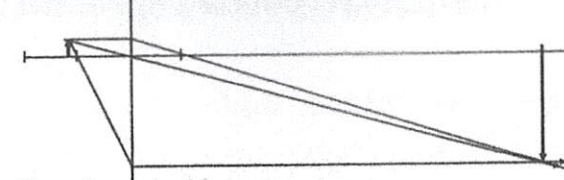


Gambar 4.2.a. Obyek diletakkan diluar $2F_2$: gambar nyata, terbalik, lebih kecil.

Gambar 4.2.b. Obyek diletakkan tepat diluar F_1 atau F_2 : gambar nyata, terbalik, ukuran sama.

Object is placed just outside F_1

Real, inverted, larger image



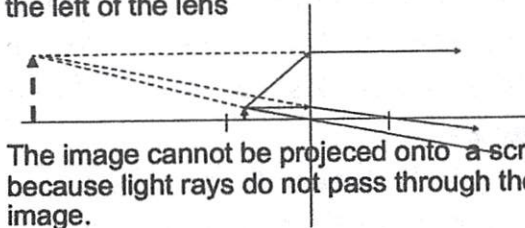
$m = -s/f$ -: inverted image

s : tube length of objective lense: is chosen so that the image on the F_1 of the eyepiece or ocular lens which acts as a simple magnifier. $m = 40x \rightarrow s = 4 - f = 0,1 \text{ cm}$

Gambar 4.3. Obyek diletakkan sedikit diluar F_1 : gambar nyata, terbalik, dan lebih besar

Magnifying glass: Object is located inside F_1

- The rays do not converge to a point at the right of the lens—but the rays diverge from a point to the left of the lens



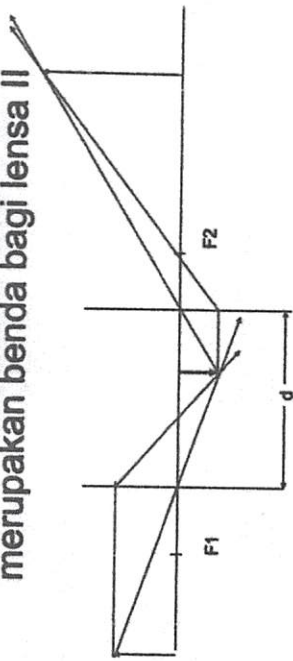
- The image cannot be projected onto a screen, because light rays do not pass through the image.

Virtual, erect, larger image!

Cahaya tidak bertemu pada poin pertemuan lensa, tetapi cahaya menyimpang dari poin kekiri dari lensa.

Gambar 4.4. Lensa pembesar: Obyek diletakkan di dalam F_1 : Gambar maya, tegak, lebih besar.

2 lensa dengan sumbu utama berimpit: bayangan lensa I merupakan benda bagi lensa II



di: jarak antara kedua lensa

2 lensa dengan sumbu utama berhimpit: bayangan lensa I merupakan benda bagi lensa II.

Gambar 4.5. Bayangan lensa I merupakan benda bagi lensa II

Rumus lensa

- $1/s + 1/s' = 1/f$
- Sebuah objek diletakkan 12 cm dikiri lensa yang mempunyai F 8 cm. Dimanakah lokasi gambar (s') A: $1/s' = 1/8 - 1/12 = 1/24 \rightarrow s' = 24$ cm dikanan dari lensa.

Kombinasi 2 lensa

- Sebuah objek berlokasi 6 cm dikiri lensa cembung (konvergen) dengan $F1 = 4$ cm. Lensa kedua $F2 = 8$ cm (lensa berbeda), berlokasi 16 cm pada kanan lensa dengan lensa yang pertama. Q : s"?
- A: $1/s' = 1/f1 - 1/s = 1/4 - 1/6 = 1/12 \rightarrow s' = 12$ cm
- Gambar yang dihasilkan oleh lensa pertama adalah gambar sejati (nyata) dan terletak 12 cm pada sisi kanannya dan $16 - 12 = 4$ cm pada sisi kiri dari lensa ke dua.

- $1/s'' = 1/f2 - 1/s' = -1/8 - 1/4 = -3/8 \rightarrow s'' = -8/3 = -2,67$ cm. Maka gambarnya adalah maya (tidak nyata) dan berlokasi 2,67cm pada sisi kiri dari lensa kedua.

Lensa Gabungan

- Kedua lensa dari lensa objektif dan okular dari mikroskop adalah lensa gabungan dengan koreksi tinggi.
- Mereka tampak sebagai lensa tipis untuk penyederhanaan.
- Lensa okuler atau yang terdapat pada bagian mata adalah pembesar.

BAB V

APA YANG DAPAT DIKERJAKAN FLOWSITOMETRI

Yang paling dikenal, flowsitometer dipakai untuk CD4/CD8. Selain pemeriksaan CD4, CD8 untuk diagnosis dan memantau kemajuan terapi penderita HIV adalah darah lengkap untuk sitokin intrasel dengan flowsitometer. Umumnya lebih dahulu dilakukan preparasi sampel.¹⁸

1. Persiapan protokol.²⁴

Sesuai ukuran yang dikehendaki, sellular atau sub selular; ppm/ppb/ atau ppt (ppb/subppb) instrument detektor analisis yang ada, pemeriksaan rutin yang dilakukan flowsitometer khusus urine, cari resep kit untuk mewarnai urin. Untuk memeriksa urin klinik rutin tentu berbeda dengan untuk kuman non-spesifik.

2. Persiapan pecah belah.

3. Persiapan reagen.

Reagen dengan besaran 5 g atau 5 mg menentukan harga. Kemasan 5 g adalah 5000 mg dengan harga 1000x lipat.

4. Persiapan alat instrument, misalnya: Vortex dan Sonicator bath, Ultra Sound untuk vibrasi.

Salah satu pemeriksaan secara ringkas dan detail dapat dibaca di jilid 3 : flowsitometer untuk peneliti.

5.1. Protokol *Whole blood* untuk intraseluler sitokin pada flowsitometri

Stimulasi dan protokol pewarnaan untuk seluruh darah manusia sangat penting: Darah harus dikumpulkan ke dalam tabung heparin.⁸ Bukan EDTA, tentunya berbeda bila yang ingin diperiksa adalah kultur limfosit.

No.	Protokol untuk <i>Whole blood</i>
1	Sampel Darah utuh dengan 0.5 ml heparinized, masukkan ke-2 tabung a 5 ml, dengan 12 x 75 mm tabung bertutup snap cap. Tambahkan medium kultur ke setiap tabung untuk sampai volume menjadi 1 ml.
2	Tabung pertama tambahkan 10 ug Brefeldin A, label: populasi sel 'resting' [20 ml stock solution 0.5 mg/ml dalam 100% EtOH dan simpan di -20°C]. Campur dengan lembut.
3	Tabung kedua: tambahkan 10 µl Brefeldin A, 25 ng PMA [2.5 ul stock solution PMA (Phorbol Myristate Acetate) dalam konsentrasi 1 mg/ml dalam DMSO dan encerkan 1:100 dalam medium sel kultur dan simpan pada -20°C, label: populasi sel 'diaktifkan' [1 mg ionomycin (1 ul stock solution ionomycin pada konsentrasi 1 mg/ml dalam DMSO simpan pada -20°C)].
4	Inkubasi 2 tabung 4 jam 37°C dalam inkubator lembab 7.5% CO ₂ , semuanya untuk maksud proliferasi atau kultur.
5	Diakhir 4 jam, campur sel kembali. Tiap sampel yang dianalisis, alikuot 100ul dari suspense sel yang dipreparasi ke dalam tabung 5ml, 12 x 75 mm bertutup snap cap.
6	Tambahkan sejumlah yang direkomendasikan konjugat antibodi yang ditujukan untuk marker immunotyping permukaan sel yang diminati (misalnya CD3 tiga warna) – CD 3 adalah marker khas semua limfosit T matang.
7	Vortex tiap tabung dengan lembut untuk mencampur dan inkubasi 15 menit dalam ruang gelap suhu kamar.
8	Tambahkan 100 ul Reagen A (medium fiksasi) FIX & PERM kit (Cat.no.GAS-003 or GAS-004). Campur lembut dan inkubasi 15 menit dalam gelap suhu kamar.
9	Cuci dengan medium pencuci (PBS + 0.1% NaN ₃ + 5% FBS). Pakai hati-hati, ketika sel pellet menjadi kurang kohesif di pencucian kedua.
10	Sel yang telah dicuci ditambahkan 100 µl of Reagent B (Medium Permeabilisasi) dari FIX & PERM kit dan jumlah yang direkomendasikan dari anti-sitokin andibodi-antibodi atau kontrol-kontrol isotype yang sesuai.
11	Vortex 1-2 detik dan inkubasi 20 minutes dalam <u>ruang gelap suhu kamar</u> .
12	Cuci 2x dengan medium pencuci dan sesuspensikan kembali sel-sel dalam 0.1% paraformaldehyde.
13	Analisis sel-sel dengan flowsitometri dalam 18 jam.

Advisory: Analyze by gating on SSC vs. FL3 (or the appropriate TRI-COLOR channel).

Terapan: no. 3, papari dengan antibiotic, antivirus dan antioksidan betakaroten 2 ppm (3 macam beta karoten, 3 dosis → 9 dosis), lanjutkan dengan no. 4 inkubasi 4 jam dalam CO₂ 7,5%, No. campur tabung resting dan tabung kultur. dan no. 6 warnai dengan MTGreen, MSRed, dan background CD3 FITC/CD4PE/CD45-PerCP. No. 7 vortex, 8 Fix 9 wash 2x, 10 Perm, 11 vortek, 12 wash 2x → resuspend dengan formaldehyde, 13 analisa dengan flow dalam 18 jam. Bila baca jam 2 siang, maka kerjakan jam 6 pagi + 6 jam = jam 12 selesai! MS Red juga baca dengan mikroskop konfokal.

Terapan uji beda limfosit T darah perifer dan limfonodi mesenterika. Hipotesis uji paparan 2 macam beta karoten b1 2ppm vs b3 24 ppm, terdapat beda bermakna pada limfosit perifer, sedangkan pada lmn mesenterika tidak berbeda bermakna karena mengandung antioksidan intrinsik. Periksa dengan MitoSOX Red.

5.2. Prinsip-Prinsip Prosedur Flowsitometri (FC)

Adalah teknologi inovatif dengan karakteristik sel-sel yang berbeda secara simultan dianalisis pada basis sel tunggal. Ini dicapai dengan cara pemfokusan hidrodinamik sel-sel yang lolos sejajar satu per satu di depan serangkaian detektor cahaya; pada saat yang sama mereka diterangi oleh sinar laser. Interaksi sel-sel dengan sinar laser menghasilkan sinyal dari dua jenis yang berbeda: yang dihasilkan oleh cahaya terdispersi (FSC/SSC), yang terutama mencerminkan ukuran sel dan kompleksitas internalnya, dan yang terkait dengan emisi cahaya oleh fluorochromes hadir dalam sel. Sinyal-sinyal ini menjadi impuls listrik yang diperkuat dan terdaftar sebagai

sinyal digital untuk diproses oleh komputer. Ketika reagen ditambahkan ke sampel, yang *fluorochrome* berlabel MAb hadir dalam ikatan reagen yang khusus untuk antigen mereka diarahkan melawan, memungkinkan deteksi oleh FC dari populasi sel dibawa oleh antigen. Populasi eritrosit, yang dapat menghambat deteksi populasi target, dihilangkan dengan menggunakan larutan sel darah merah sebelum mengambil sampel pada cytometer. Penggunaan larutan *lysing* eritrosit *Quicklysis*™ (CYT-QL-1) dianjurkan, karena tidak memerlukan langkah pencucian lebih lanjut dan tidak mengandung fiksatif, sehingga meminimalkan penanganan sampel dan menghindari hilangnya sel yang terkait dengan proses sentrifugasi.^{3,4} Jumlah sel T helper/induser (CD3+ CD4+) dinyatakan sebagai persentase dari jumlah total limfosit atau leukosit yang ada dalam sampel yang dapat ditentukan sendiri oleh FC berdasarkan pola khas FSC/SSC (ukuran/granularitas atau kompleksitas). Karena setiap flowcytometer memiliki karakteristik operasi yang berbeda setiap laboratorium harus menentukan prosedur operasi yang optimal. Komposisi reagen CD4 monoklonal murni Antibodi yang terkonjugasi dengan R-phycoerythrin (PE), dipasok dalam saline buffer fosfat dengan 0,1% natrium azida. Klon: Edu-2 Isotipe: Pemurnian IgG2a: Kromatografi Afinitas Jumlah per 1 ml vial: 200 tes (5 µl MAb hingga 10⁶ sel) Reagen tidak dianggap steril.^{8,19}

Preparasi lain:

Secara singkat, saya x IO⁶ sellmL dirangsang selama 5 jam dengan phorbol myristate acetate (PMA) 5 ng/mL dan ionomycin 1 pmol/L dalam kehadiran monosit penghambat protein-sekresi 1 pmoVL (semua dari Sigma). Sel dicuci dua

kali dengan buffer fosfat dingin saline (PBS) dan difiksasi dengan PBS/4% paraformaldehyde (pada 4°C, 10 menit). Fiksasi diikuti oleh permeabilisasi dengan PBS mengandung 0,1% saponin (Sigma) ditambah dengan 10% manusia serum dikumpulkan (pada 4°C, 10 menit). Untuk semua inkubasi berikutnya dan langkah pencucian, PBS/O. 1% saponidOS% bovine serum albumin (BSA) digunakan.^{7,8} Pewarnaan sitoplasma dengan sitokin biotinilasi MoAb (5 pg/mL) diikuti oleh inkubasi dengan Streptavidin Merah 670 (keduanya pada 4°C, 20 menit). IgG1 tikus yang diberi biotinilasi adalah digunakan untuk memverifikasi kekentalan pewarnaan sitokin MoAb. Analisis dilakukan pada FACScan.²²

Catatan:

Bila pewarna fluoresense organic terkenal tidak foto stabil, tidak demikian dengan deteksi menggunakan Qdot kristal nano, semikonduktor tidak kehilangan intensitas walau setelah pajanan sinar laser 1 jam secara terus menerus. Immunofluoresense FITC dan Alexa 546 setelah 5 menit pajanan, hampir sempurna tak nampak.⁵ Sampel yang dipersiapkan dapat dikontrol/dilihat terlebih dahulu dengan mikroskop immunofluoresense.⁹

BAB VI

TIPE-TIPE FLOWSITOMETER

Dalam bioteknologi, flowsitometer adalah teknologi biofisik berbasis laser atau impedansi yang digunakan dalam penghitungan sel, pemilahan sel, deteksi biomarker dan rekayasa protein, dengan menanggukkan sel dalam aliran cairan dan melaluinya melalui alat deteksi elektronik. Sebuah flowsitometer memungkinkan analisis multiparametrik simultan dari karakteristik fisik dan kimia hingga ribuan partikel per detik.

Flowsitometri secara rutin digunakan dalam diagnosis gangguan kesehatan, terutama kanker darah, tetapi memiliki banyak aplikasi lain dalam penelitian dasar, praktik klinis dan uji klinis. Variasi yang umum melibatkan menghubungkan kemampuan analitis dari flowsitometer ke alat penyortiran, untuk memisahkan secara fisik dan dengan demikian memurnikan partikel yang menarik berdasarkan sifat optiknya. Proses semacam itu disebut pemilahan sel, dan instrumen ini umumnya disebut "penyortir sel".²⁶

Tipe-tipe Flowsitometri :

1. FACS Aria 4 laser
2. FACS Aria III
3. FACS Calibur 2 laser
4. LSRII 5 laser
5. LSR Fortesa 4 laser dengan kemampuan deteksi hingga 18 warna serentak
6. 5 Laser optional
7. FACSCanto 3 laser-Canto II
8. FACS

9. FACS Diva

10. FACS Vantage (FACS Diva + kemampuan sorting, memisahkan sel menurut jenisnya menggunakan medan magnet), pengembangan FACS Aria II
Semuanya buatan BD, Fluorescence Activated Cell Sorting dipergunakan untuk koleksi data.

Perangkat lunak menggunakan Microsoft and Windows: CellQuest, sedangkan bila menggunakan Mac dipakai perangkat lunak FlowJo untuk menganalisis data flowsitometri CyTOF, sebuah sitometri masa (fluidigm) yang mewarnai sel tunggal dengan ikatan antibodi yang diikatkan pada isotope stabil dengan pewarna lebih dari 100. Beda massa isotope Z) ini yang dipakai untuk mengenali protein yang berbeda di dalam dan dinding sel. Ingatkan nomor atom dan nomor masa sebuah atom dalam sistem periodik unsur kimia.

Yang lain dikenal buatan Cytobuoy (Belanda) dengan 3 tipe: Cytobuoy, cytosub dan cytosense Cytosub digunakan untuk memantau pertumbuhan dan densitas plankton di North Sea.

Cytobuoy digunakan di laut lepas/lepas pantai (*offshore*) terapung di permukaan air laut, dan Cytosense yang kebanyakan *onshore*, digunakan *portable*. Memang Belanda terkemuka dibidang ilmu penggunaan kombinasi lensa untuk melihat jasad renik sejak mikroskop pertama lahir (1590) dan digunakan pertama kali untuk melihat bakteri dan protozoa (1674) oleh Leuwenhoek.^{7,9}

Perangkat lunak Cytoclus (Cluster Analysis) digunakan untuk membaca dan analisis data hingga ditampilkan pada layar LCD juga pertama kali dilakukan pada mikroskop fluoresensi *portable* di Belanda.²⁸

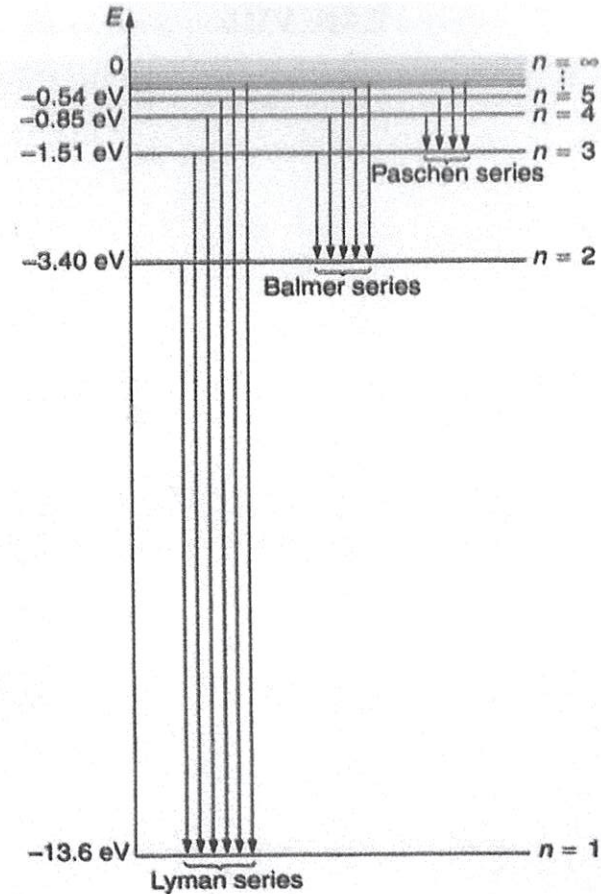
Setiap pabrik memang membuat perangkat lunaknya sendiri yang kompatibel dengan instrumennya, dijual tersendiri perangkat lunaknya, walau juga *free download*. Flowsitometer *portable* yang lain adalah Accuribuatan BD, setelah Cytosense buatan Cytobuoy. Beckman Coulter juga membuat dan juga menjual flowsitometer, reagen serta perangkat pemeriksaan.

BAB VII

PEWARNA FLUORESENSI DAN SERI BALMER

Pewarna organik fluoresensi (*fluorochrome*) dan pewarna nanokristal (*fluoropore*) dengan menggunakan prinsip semikonduktor dipakai dalam pemeriksaan biologi molekular, sel dan organel sel. Yang terakhir memberikan emisi fluoresensi yang konsisten walaupun menggunakan laser dengan panjang gelombang berbeda. Di atas telah kita kenal keduanya tetapi dasar dari pewarna fluoresensi telah ada pada pelajaran SMA. Tentu eksitasi dan emisi dengan gelombang yang lebih panjang (energi lebih pendek) adalah dasar fluoresensi, sehingga pewarna organik harus dirangsang (eksitasi) dengan energi yang lebih tinggi atau panjang gelombang yang lebih pendek.¹¹

Garis Paschen (seri infra red), Balmer (seri cahaya tampak), Lyman (seri UV) dll. dalam seri spectrum hydrogen perlu kita pahami sebagai dasar pewarna fluoresensi.¹⁰



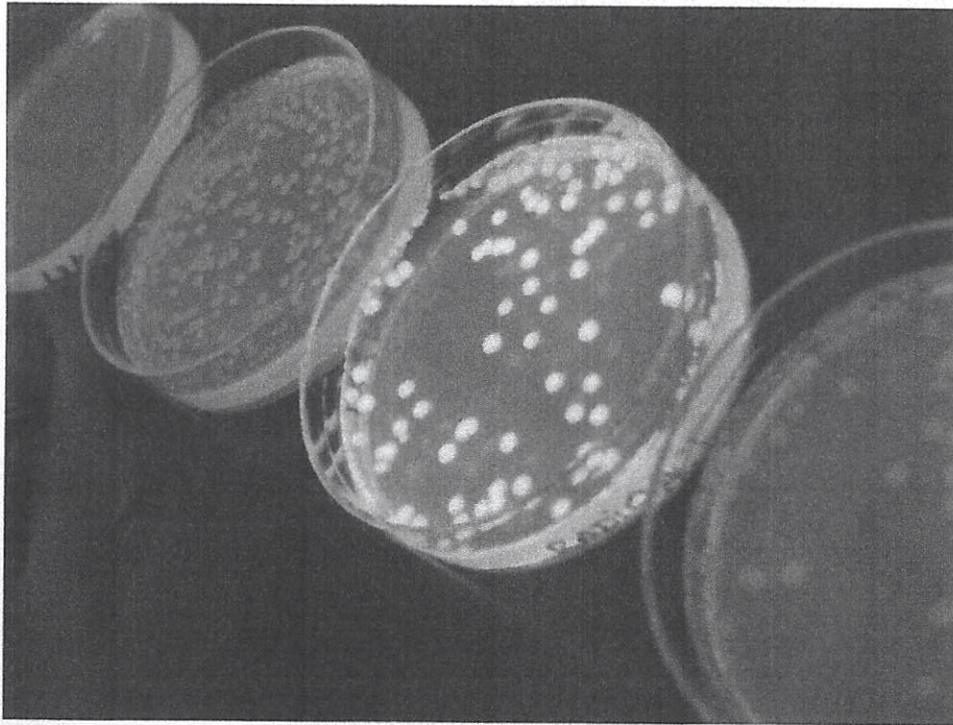
Gambar 7.1. Garis Paschen, Balmer dan Lyman pada seri spektrum hidrogen.

<https://www.google.co.id/search?q=balmer+series&oq=Balmer+s&aqs=chrome.0.0j69i57j0l4.7273j0j7&sourceid=chrome&ie=UTF-8>

BAB VIII

WARNA PELANGI FLUORESENSI ROGER TSIEN MENGUNAKAN GEN WARNA KORAL

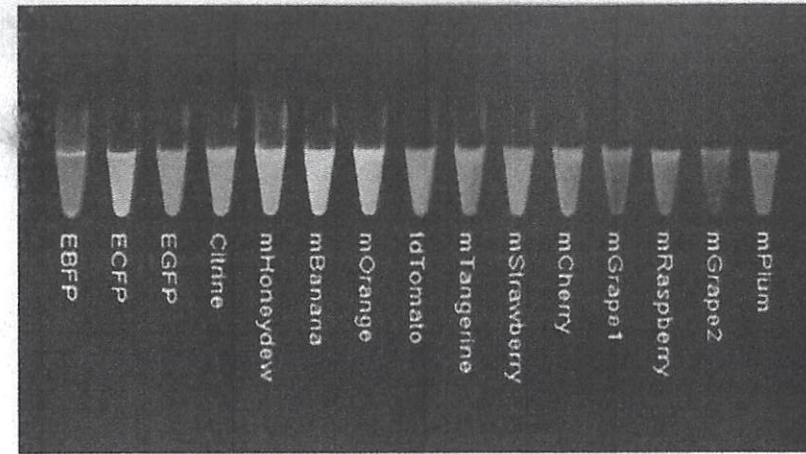
Penerima hadiah Nobel 2008 Roger Tsien terkenal dengan gambar kuman yang diwarnai untuk melukis matahari terbenam (sunset), laut dan pohon kelapa di petri dish dan dikenal sebagai petri dish Roger Tsien. Sinar emisi fluoresensi visual memang tampak cantik di tempat gelap.¹²



Gambar 8.1. Petri dish dengan koloni bakteri yang diwarnai Fluoresensi

https://www.google.co.id/url?sa=i&rct=j&q=&esrc=s&source=images&cd=&cad=rja&uact=8&ved=2ahUKEwiRlrCExo7dAhXJqI8KHR4eDDwQjB16BAgBEAQ&url=http%3A%2F%2Fneuroscience.onair.cc%2Ftsien-lab-ucsd%2F&psig=AOvVaw0AZye2_NBXyXpg7uWmDWyQ&ust=1535504396940213

Berikut warna pelangi pewarna fluoresensi.



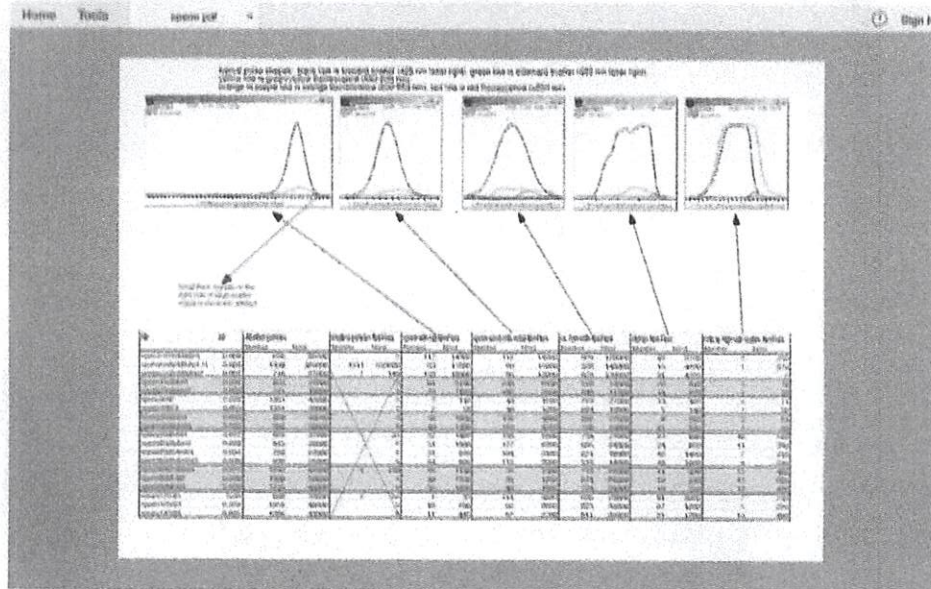
Gambar 8.2. Pewarna fluoresensi tidak selalu hanya satu warna, tapi terdapat beberapa jenis warna seperti yang tampak pada gambar.

Green Fluorescence Protein (GFP) adalah yang pertama dikembangkan, diambil dari gen warna ubur-ubur (*jelly fish*). Pewarna-pewarna ini dibuat dari gen warna koral di laut daerah hutan hujan tropis yang lembab dan hangat (*wet and warm*) seperti Indonesia dan Asia Tenggara (SEA) lainnya.³¹

BAB IX

HASIL GAMBAR SEL DENGAN FLOWSITOMETER

Spermatozoa dengan kekhasan ekornya yang penuh dengan deretan mitokondria, bagus untuk contoh bagaimana bentuk spermatozoa dilihat dengan mikroskop fluoresensi setelah diwarnai dengan MT Green.



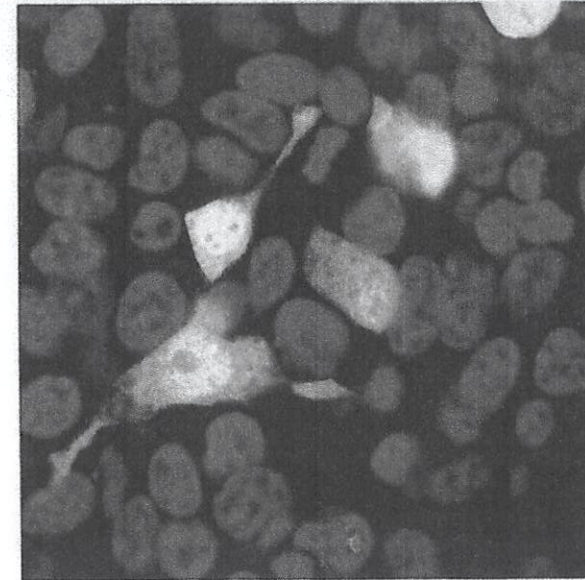
Gambar 9.1. Optical scan bentuk spermatozoon dengan Cytosence dan Software Cytocluse

Cytoclus software dapat mengklasifikasikan partikel, dengan 5 profil sinyal dan tiap partikel diukur dalam 6 rupa: panjang, kekuatan sinyal, faktor terisi, simetri, inersia, dan jumlah puncak. Berdasarkan scatter tersebut dapat dikenali jenis bakteri yang melewati nozzle.

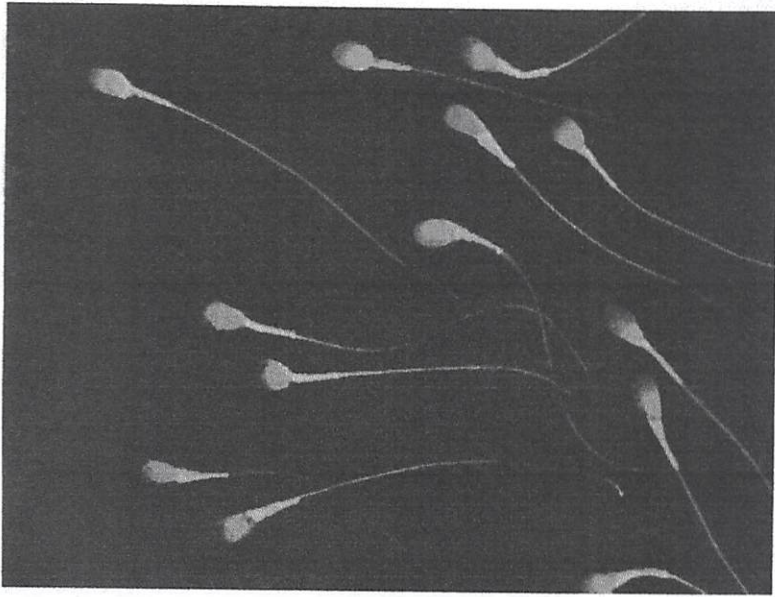
https://www.google.co.id/search?q=cytobuoy+flow+cytometry&source=lnms&tbn=isch&sa=X&ved=0ahUKewislafZ0_jTAhUDrI8KHXbhA18Q_AUICigB&biw=643&bih=643#tbn=isch&q=cytobuoy+flow+cytometry+particle+signa

[l+strength&imgsrc=tFC66OwJ-](https://www.google.co.id/search?q=cytobuoy+flow+cytometry&source=lnms&tbn=isch&sa=X&ved=0ahUKewislafZ0_jTAhUDrI8KHXbhA18Q_AUICigB&biw=643&bih=643#tbn=isch&q=cytobuoy+flow+cytometry+particle+signa)

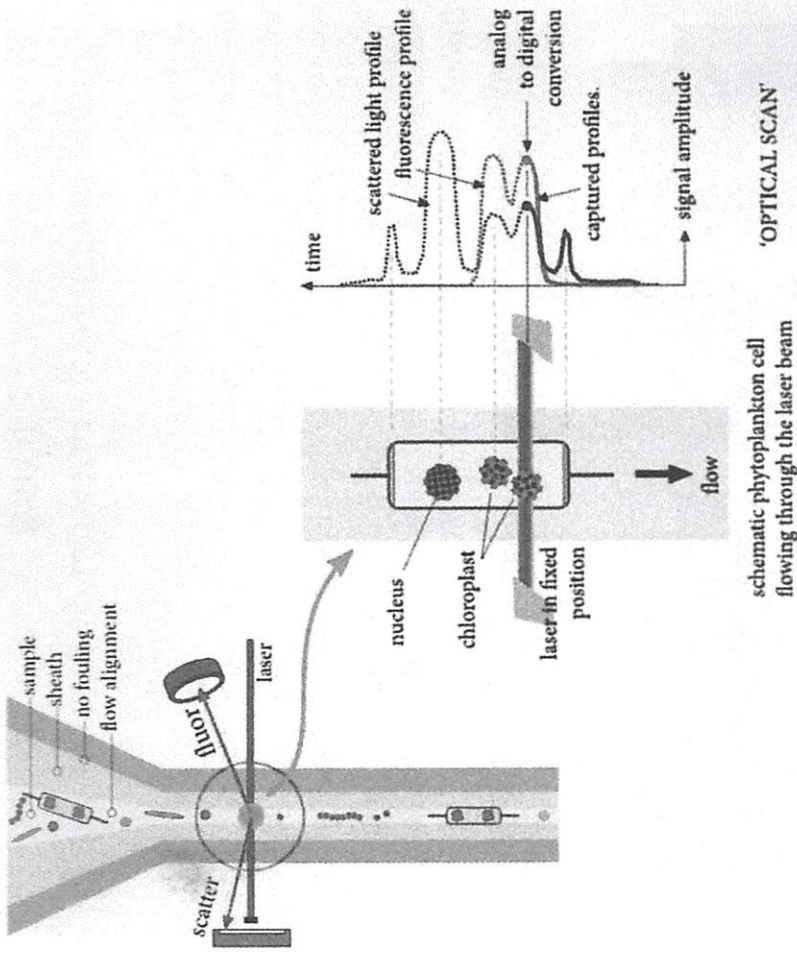
[M0bfM:https://www.google.co.id/search?q=cytobuoy+flow+cytometry&source=lnms&tbn=isch&sa=X&ved=0ahUKewislafZ0_jTAhUDrI8KHXbhA18Q_AUICigB&biw=643&bih=643#tbn=isch&q=cytobuoy+flow+cytometry+particle+signa](https://www.google.co.id/search?q=cytobuoy+flow+cytometry&source=lnms&tbn=isch&sa=X&ved=0ahUKewislafZ0_jTAhUDrI8KHXbhA18Q_AUICigB&biw=643&bih=643#tbn=isch&q=cytobuoy+flow+cytometry+particle+signa)



Gambar 9.2. Bentuk spermatozoa hasil analisis cytocluse.³¹



Gambar 9.3. Spermatozoa hasil pewarnaan dengan MTG Mito Tracker Green dibaca dengan mikroskop fluoresensi.¹¹

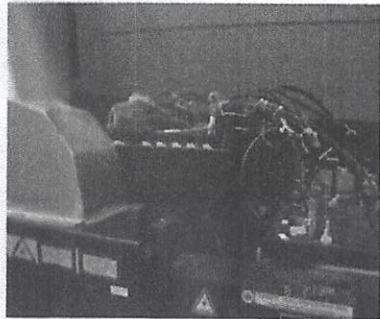


Gambar 9.4. Scan Optik rekonstruksi dengan 'software' yang dapat tampak di LCD serta dicetak pada kertas.

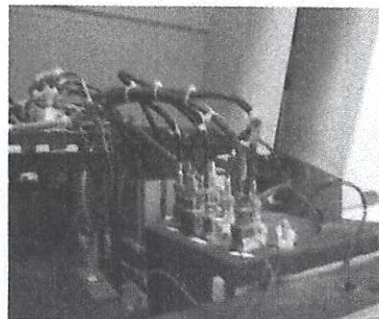
BAB X

STRUKTUR DAN FUNGSI FLOWSITOMETER

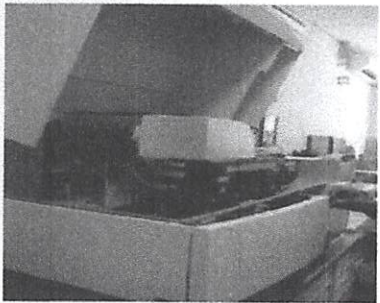
Ketika sel fluoresensi melewati sinar laser, itu menciptakan puncak atau pulsa emisi foton dari waktu ke waktu. Ini dideteksi oleh PMT dan dikonversi ke pulsa tegangan, yang dikenal sebagai peristiwa. Ketinggian pulsa total dan luas diukur dengan flowsitometer. Area pulsa tegangan terukur akan berkorelasi langsung dengan intensitas fluoresensi untuk peristiwa itu.²⁴



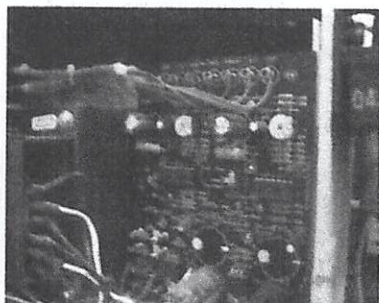
Gambar 10.1. Perangkat dalam flow dan optik sebuah flowsitometer.



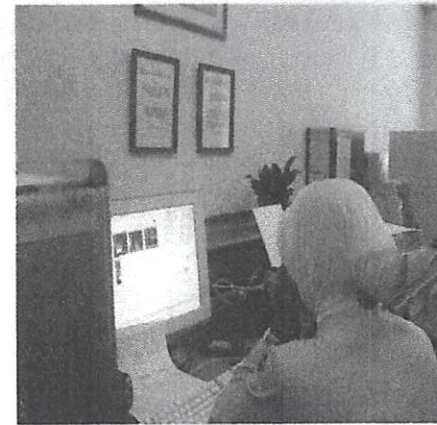
Gambar 10.2. Bagaimana media cairan dipompakan dan sinar laser ditembakkan.



Gambar 10.3. Perangkat Flow membutuhkan banyak media cair untuk mengalirkan jasad renik atau sel darah melalui nozzle.



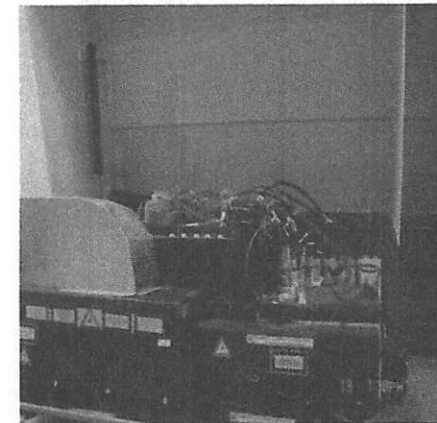
Gambar 10.4. Komponen elektronik sebuah flowsitometer.



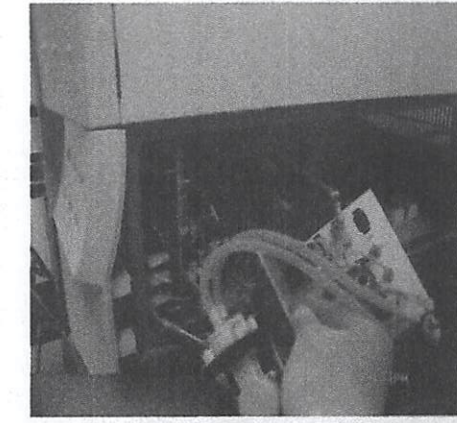
Gambar 10.5. Petugas membaca hasil analisis detektor Emisi sel-sel yang telah diwarnai.



Gambar 10.6. Air, pompa air, penampung air limbah; nozzle, 4-6 sinar laser, sensor or detektor pembaca sinar yang diemisikan; Unit penganalisis data.



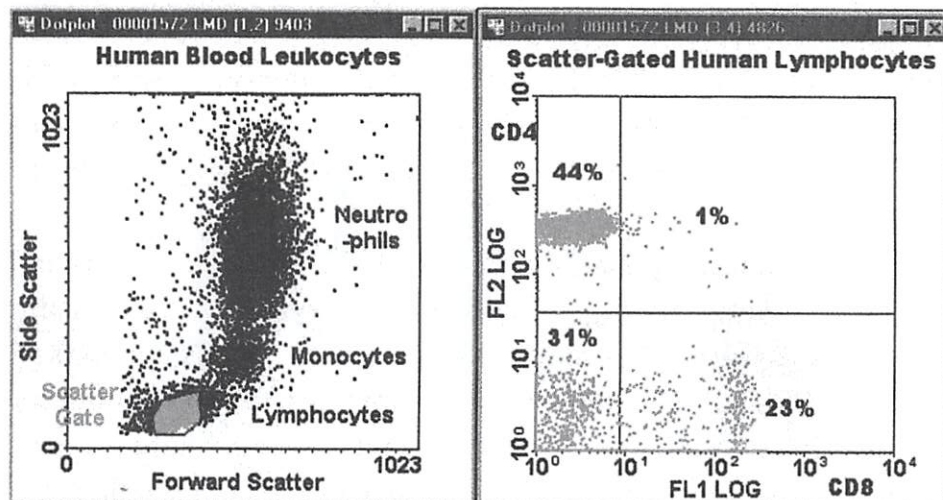
Gambar 10.7. Flow: pompa, media cairan (air) untuk pembersih; Cyto: nozzle dan sumber cahaya sinar laser; serta meter: hardware and software, LCD and printer.



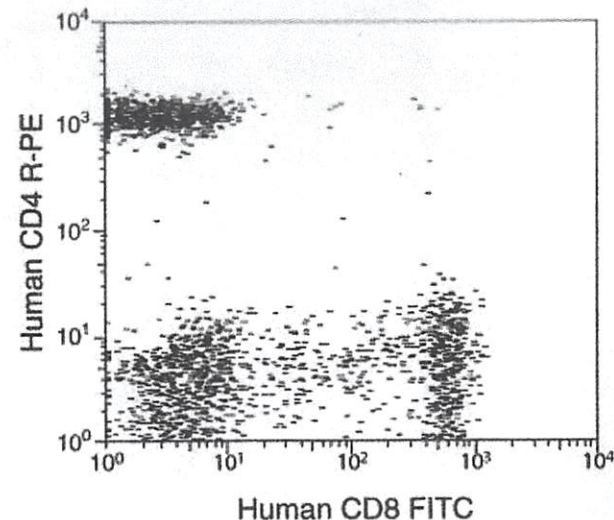
Gambar 10.8. Menjaga rheology nozzle dan aliran air/pompa air, penampung limbah menjadi problem maintenance yang utama.

helper/inducer (CD3+CD4+), dan untuk itu dapat dipakai untuk merepresentasikan karakteristik limfosit-limfosit. Penelitian ini luas dipakai untuk monitor status kekurangan pada penderita paska transplantasi, penurunan daya tahan, penyakit autoimmune, leukemia dll. Individu-individu dengan HIV menunjukkan penurunan menetap jumlah sel limfosit T helper/induce sebagai kelanjutan infeksi. CD3 merupakan petanda seluruh limfosit T, CD8 merepresentasikan T_C/T_S, CD25 T dan B, CD40 semua limfosit B.^{12,15}

Note: X var: Forward scatter FSC; Y var: Side Scatter SSC

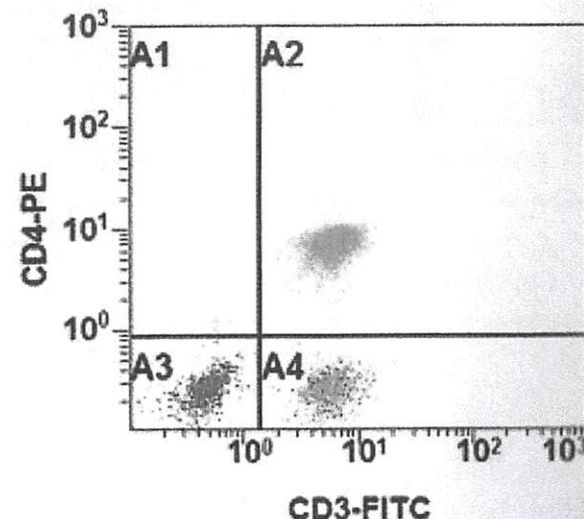


Gambar 11.1. Subpopulasi-subpopulasi berdasarkan FSC vs. SSC: Limfosit-limfosit, Monosit-monosit, Neutropil-neutropil.

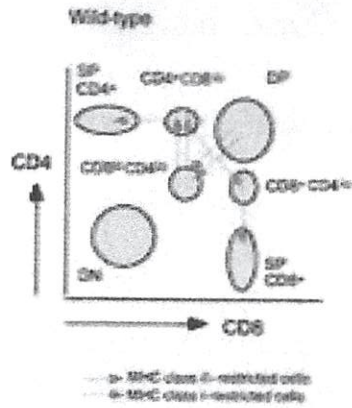


Gambar 11.2. X: Emisi CD8/FITC dan Y: CD4R-PE

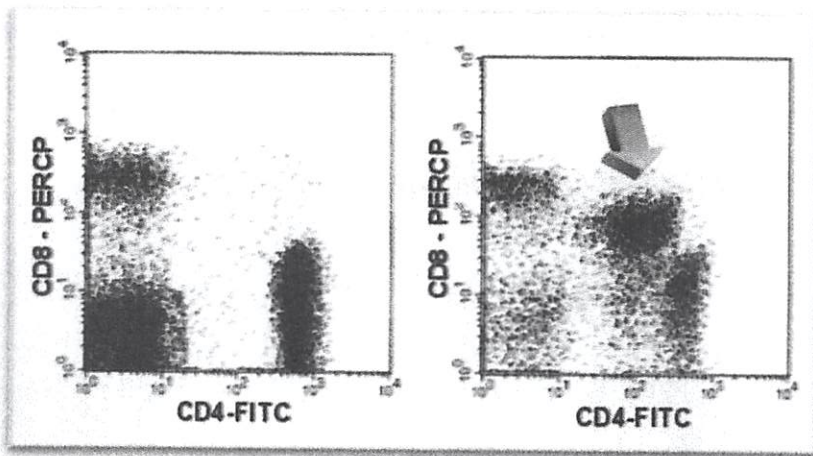
:D3-CD4 002_modified001.lmd : FL1 Log/FL:



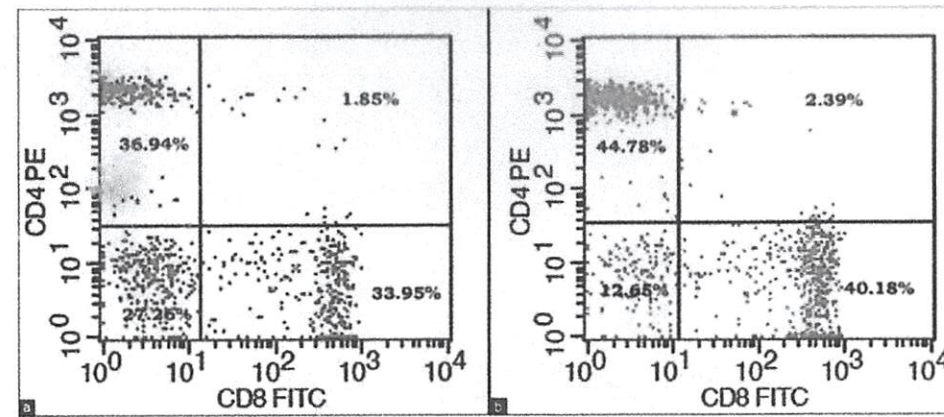
Gambar 11.3. X: Emisi CD3-FITC, Y: Emisi CD4-PE



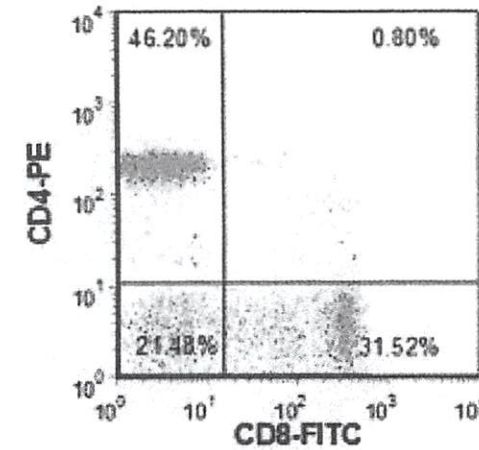
Gambar 11.4. X: CD8 dan Y: CD4, tampak lokasi sel-sel tersebut



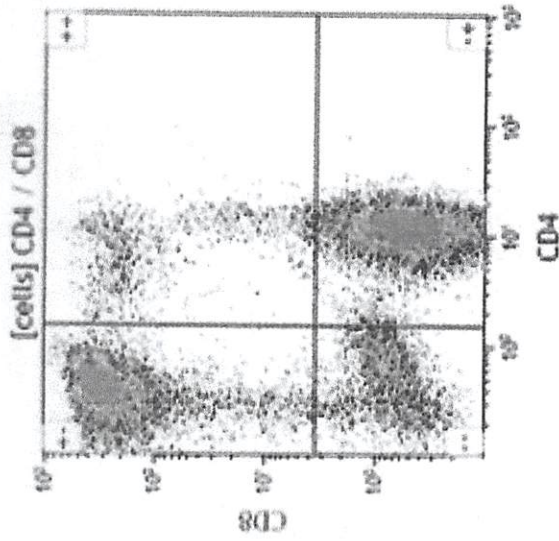
Gambar 11.5. A. Tak ada sel dengan marker CD4/CD8; B. Banyak Cel CD4/CD8 positive.



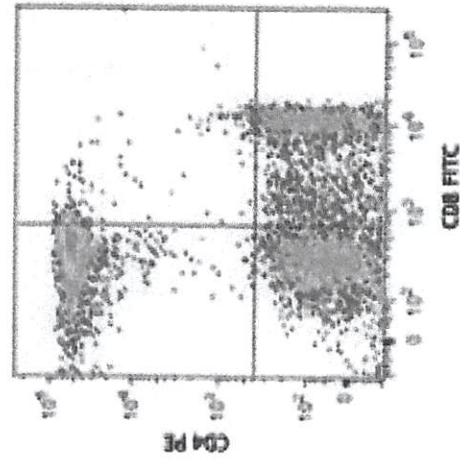
Gambar 11.6. a. CD4-PE: 36,94%; b. CD8-FITC 40,18%



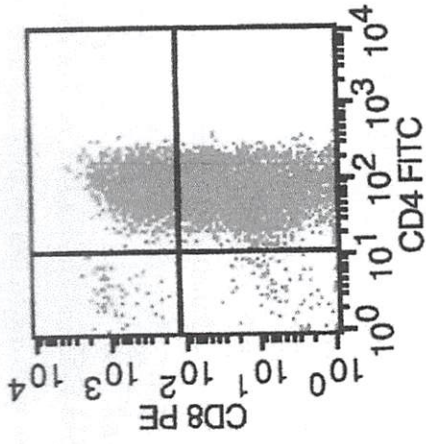
Gambar 11.7. CD4-PE 46,20% dan CD8-FITC 31,52%



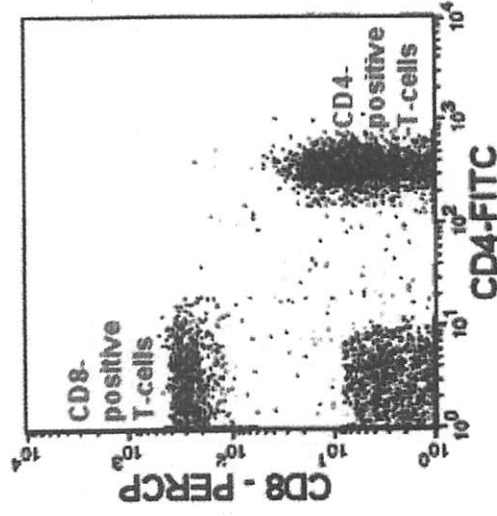
Gambar 11.8. CD8: PN (positive, negative) CD4 (NP; CD4/CD8 + di kotak kanan atas DP (Double Positive) dan DN (Double Negative).



Gambar 11.9. CD4/CD8 DN

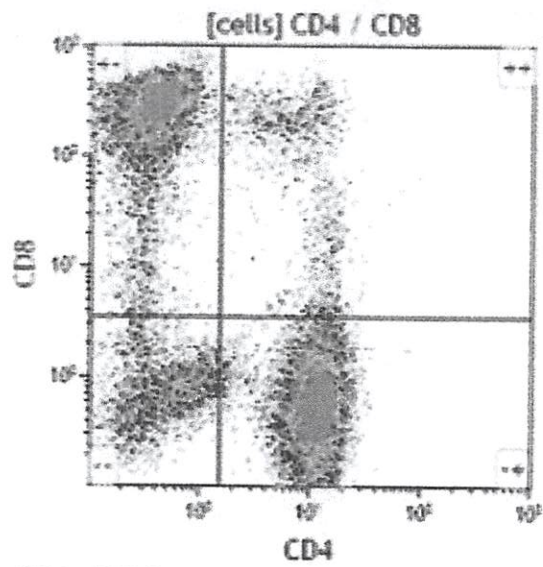


Gambar 11.10. CD4/CD8 DN

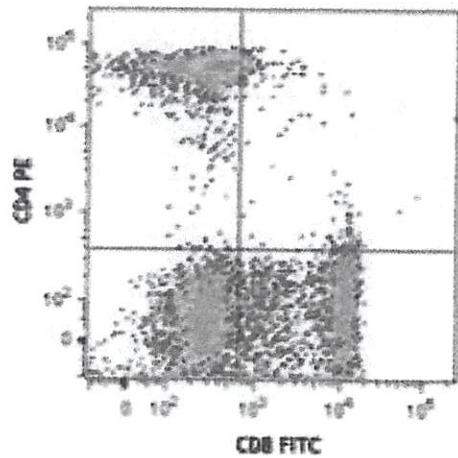


Protocol:

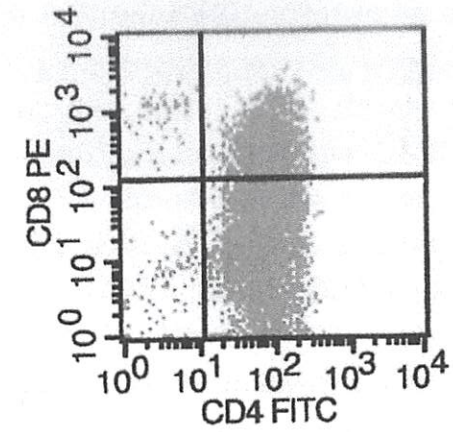
1. Untuk setiap sampel yang akan dianalisis, tambahkan volume antibodi terkonjugasi yang tepat yang diarahkan ke penanda permukaan sel (s) yang diinginkan dan/atau



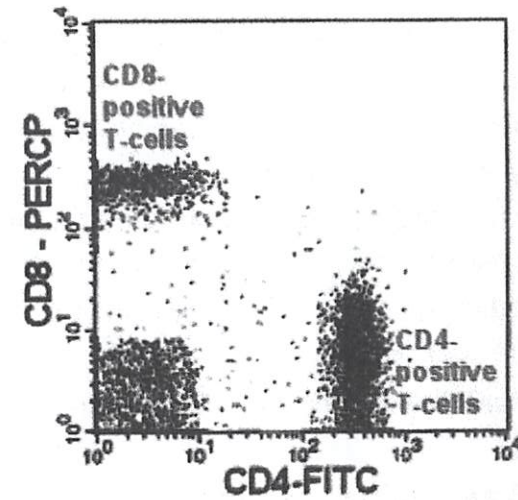
Gambar 11.8. CD8: PN (positive, negative) CD4 (NP; CD4/CD8 + di kotak kanan atas DP (Double Positive) dan DN (Double Negative).



Gambar 11.9. CD4/CD8 DN



Gambar 11.10. CD4/CD8 DN



Protocol:

1. Untuk setiap sampel yang akan dianalisis, tambahkan volume antibodi terkonjugasi yang tepat yang diarahkan ke penanda permukaan sel (s) yang diinginkan dan/atau

- kontrol isotipe appropriate ke tabung 5 ml, 12 x 75 mm yang sesuai.
2. Pipet 100 μ l darah utuh atau sel yang disesuaikan (dirangsang PBMC, sumsum tulang, limpa, timus). Setara dengan 1 x 10⁶ sel, ke setiap tabung.
 3. Vortex setiap tabung dengan lembut untuk mencampur, dan menetaskan selama 15 menit dalam gelap pada suhu kamar.
 4. Tambahkan 100 ml Reagen A dan inkubasi selama 15 menit dalam gelap pada temperatur ruang.
 5. Cuci sekali dengan 3 ml *wash* medium (PBS + 0,1% NaN₃, + 5% FBS).
 6. Centrifuge selama 5 menit pada 300-350 x g, supernatan aspirat, dan vortex untuk sepenuhnya meresap pelet sel.
 7. Tambahkan 100 μ l Reagen B (Perm Medium) dan volume antibodi intraseluler yang direkomendasikan dari kontrol isotipe yang sesuai.
 8. Vortex 1-2 detik dan inkubasi selama 20 menit dalam gelap pada rt
 9. Cuci sekali dengan 3 ml wash medium (PBS + 0,1% NaN₃, + 5% FBS).
 10. Centrifuge selama 5 menit pada 300-350 x g dan aspirasi supernatan.
 11. Resuspend sel dalam selubung cairan untuk analisis segera, atau perbaiki dalam 0,5 ml 0,1% paraformaldehide dan simpan pada 2-8°C dalam gelap. Sel-sel yang diperbaiki harus dianalisis dalam waktu 18 jam.

BAB XII

APLIKASI UNTUK PENELITIAN, PEMANTAUAN DAN PENENTUAN DIAGNOSIS

Dalam Bab 10 telah kita lihat bagaimana flowsitometri mengukur CD4 dan CD8 dalam diagnosis dan memantau hasil pengobatan serta penentuan prognosis. Masih banyak marker lain dapat diwarnai dan dibaca dengan flowsitometri selain CDs, sitokin proinflamasi, sitokin proapoptosis, sitokin profibrosis dan sitokin-sitokin lain. Dalam bab terdahulu juga diceritakan bagaimana meneliti, memantau, dan penentuan prognosis plankton di kedalaman laut dan lepas pantai dimana data dikirim dengan gelombang radio ke laboratorium pusat dan dianalisis oleh cytocluse.²⁵

Memang dalam satu masa instrumen kedokteran menginspirasi instrumen kelautan dan kemaritiman, dan sebaliknya di masa yang lain. Saat ini biopolymer dari limbah hasil laut hutan hujan tropis dikejar seluruh dunia dengan pagu dana ke arah sana, sehingga tak ada salahnya, dunia kedokteran ganti melihat bagaimana flowsitometer digunakan untuk memantau plankton dan jasad renik di kedalaman lautan SEA dan North Sea.¹⁴

Salmon Norwegia memang terkenal dalam ranah kuliner tetapi tak pernah disebutkan bagaimana ekosistem jasad renik dijaga untuk dibudidayakan dengan sehat sesuai etika dan moral kedokteran. Laut sekitar Norwegia, Swedia, Finlandia dan Denmark yang dikenal sebagai daerah Scandinavia dikenal sebagai North Sea. Sedang daerah *onshore*nya disebut sebagai Highland oleh Belanda yang dikenal sebagai Lowland, dibawah permukaan laut.¹⁸

Kapasitas aliran cytometry untuk cepat, analisis individu dari sejumlah besar sel akan muncul untuk membuatnya ideal disesuaikan untuk studi kematian sel. Beberapa metode aliran cytometry tersedia yang terutama menggunakan perubahan dalam DNA, sifat pencar cahaya, atau membran permukaan untuk menilai kematian sel.¹¹

Flowsitometer adalah teknik cepat, serbaguna dan kuat yang memungkinkan untuk penilaian kualitatif dan kuantitatif dari beberapa parameter sel dan partikel individu. Dengan fleksibilitas flowsitometer, dan keandalan hasil, teknologi ini telah menjadi instrumen penelitian kedokteran hewan yang penting dengan kemampuan diagnostik klinis yang penting, terutama di bidang imunologi dan hematologi.¹³

Dalam 50 tahun terakhir, beberapa teknik telah merevolusi kedokteran laboratorium. Tidak diragukan lagi flowsitometer adalah salah satunya, dengan dampak besar pada diagnosis dan pemantauan penyakit di laboratorium hematologi, hemostasis dan imunologi. Perkembangan dalam teknologi aliran juga memberikan pengaruh yang besar pada keakuratan pengujian, serta pada waktu *turn around* dan pada objektivitas dari data yang dilaporkan. Meskipun penyelidikan morfologi darah perifer dan smear sumsum tulang tetap standar emas dalam mendiagnosis gangguan hematologi ganas, baru-baru ini aliran studi sitometri merupakan persyaratan mutlak dalam menyelesaikan diagnosis leukemia de novo, sementara di daerah lain, seperti deteksi penyakit residu minimal sepenuhnya menggantikan morfologi dan telah menjadi teknik yang dapat diandalkan mengidentifikasi 1 sel leukemia di 10.000 sel normal. Kelainan trombosit glikoprotein, platelet retikulasi, serta trombosit teraktivasi semua didiagnosis hari

ini oleh teknik aliran cytometric. Untuk kelainan sel darah merah tertentu seperti paroxysmal nocturnal hemoglobinuri dan keturunan sferositosis, aliran cytometry adalah teknik kunci. Metode ini diperlukan juga dalam diagnosis immunodeficiencies, gangguan autoimun, respon sel T antigen spesifik, tes alergi dan digunakan dalam imunologi transplantasi.¹⁹

BAB XIII

PENUTUP

Interdisiplin flowsitometer mungkin bagus untuk terapan *biosafety* dan *biosecurity*. Tidak semua flowsitometer dapat digunakan secara interdisiplin, misalnya milik departemen kesehatan dan jajarannya yang digunakan untuk memantau HIV/AIDS. Yang terakhir ini memiliki persyaratan BSL 3, sedangkan flowcytometer yang dipakai untuk memantau air laut, air limbah, air kolam, orang sehat tentu dapat digunakan bersama interdisiplin. Awam dan mahasiswa peneliti lingkungan dan orang sehat dapat mengirimkan ke laboratorium interdisiplin flowcytometer sehingga tidak mengganggu program departemen kesehatan dengan rutinitas pemeriksaan CD3/CD4/CD8.²²

Perkumpulan dan pembelajaran tentang interdisiplin Flowcytometer dapat mudah dipahami dan kami telah merintisnya.

1. Flowsitometer 2005
2. ISAC Hungaria 2008
3. Tawaran ILC ke WW world Wide
4. Japan Cytometry Research

Ucapan Terima Kasih:

Terima kasih DRPM Universitas Indonesia, untuk hibah paparan bahan spesifik hutan hujan tropis iklim lembab dan hangat DRPM UI 2015 No. 1772/UN2.12/HKP.05.00/2015 dan 240BE/DRPM-UI/NI.4/2008 dan Departemen Fisika Kedokteran sub biofluida, biooptik, bioradiasi yang telah mengangkat sebuah instrumen mikroskop fluoresensi dengan

obyek bergerak: FLOWCYTOMETER ke sebuah pertemuan di Aula FKUI: 15 Februari 2005, ditandai dengan lahirnya Asosiasi Flowcytometer Indonesia.²⁸

DAFTAR PUSTAKA

1. Mutalib PKS; Kusmardi; Tedjo Aryo. THE POTENTIALITY OF \ddot{A} -CAROTENE AS FREE RADICAL SCAVENGER: A STUDY OF THE RAISE OF SUPEROXIDE PRODUCTION IN MITOCHONDRIAL LYMPHOCYTE. *Makara J Heal Res* 2009;13(1):27-33.
2. Mutalib, Peni KS; Ibrahim, AS; Dardjat, MT; Darminto, MES; Philippi B. The dancing of CD4 and CD8-PE in the firecrackers corridor increase the sensitivity-specificity of CD66e (CEA) colorectal carcinoma patients. *Cytom Research* 2010;20(1):31-4.
3. Mutalib PKS, Praptini MN, Abdullah M, Hartati M. Association of Hygiene Hypothesis with High prevalence of Allergy and Autoimmune Diseases : FMT industry. *Int J Environ Agric Res.* 2017;3(5):62-6.
4. Mutalib P, Murtani BY, Dardjat MT, Ibrahim A, Hartati M. LGBTQ : The Molecular Mechanism and its Role in Elucidating Proportional for a Better Management. *Int J Environ Agric Res.* 2017;3(9):23-9.
5. Mutalib PKS, Praptini MN, Abdullah M, Hartati M. Added Value on Sade Village and Bau Nyale Festival in Autoimmune Diseases Immunization Travel: Supported by Aptamers Technology. *Int J Environ Agric Res.* 2017;3(4):94-100.
6. MUTALIB PK, IBRAHIM ADMT. What is the firelighter of colorectal carcinoma's (CRC's) firecracker/fishbone : U-238. Are we missing this point? *Cytom Res* 2010;20(1):27-30.
7. Ninik Sukartini, Pendidikan Berkesinambungan Patologi Klinik: Makalah Lengkap. Departemen Patologi Klinik FKUI - RSCM. Jakarta. 2018.
8. Hoffmann JJML, van den Broek NMA, Curvers J. Reference interval of reticulated platelets and other platelet parameters and their association. *Arch Pathol Lab Med.* 2014; 36:499-504.
9. Yang Y, Guy D, Arutyunova Z, Cai D. Immunophenotypic Pattern of Eosinophilia by Flow Cytometry. *NAJMS* 2015; 8(1).
10. Angeletti C. A method for the Interpretation of Flow Cytometry Data Using Genetic Algorithms. *J of Pathol* 2018;9:16.
11. Haron J. Flow Cytometry and Cell Sorting : A Practical Guide Mater Methods 2013;3:165.
12. Bertho AL, Santiago MA, Coutinho SG. Flow Cytometry in the Study of Cell Death. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2000;95(3):429-433.
13. Papadogiannakis EI, Kontos VI, Tamamidou M, Roumeliotou A. Flow Cytometry and its applications. *J of the Hellenic Veterinary Medical Soc.* 2005;56(1):71-77.
14. Umlauf VN, Dreschers S, and Orlikowsky TW. Flow Cytometry in the Detction of Neonatal Sepsis. *Int J of Pediatrics* 2011. article ID 763191, 6pages. <http://dx.doi.org/10.1155/763191>.
15. Barlogie B, Raber MN, Schumann J, Johnson TS, Drewinko I, Swartzendruber DE, Gohde W, Andreef M, and Freireich E. Flow Cytometry in Clinical Cancer Research. *Cancer Research* 1983;43:3982-3997.
16. Gant VA, Warnes G, Phillips I and Savidge GF. The application of flow cytometry to the study of bacterial responses to antibiotics. *J Med Microbiol* 1993;39: 147-154.
17. Della Porta MG, and Picone C. Diagnostic Utility of Flow Cytometry in Myelodysplastic Syndromes. *Mediterranean J Hematology and Infectious Disease* 2017;9(1):e2017017, DOI <http://dx.doi.org/10.4084/MJHID.2017.017>.
18. Brown M and Wittwer C. Flow Cytometry: Principles and Clinical Applications in Hematology. *Clinical Chemistry* 2000;46(8(B)):1221-1229.
19. Lambeth CR, White LJ, Johnston RE, and de Silva AM. Flow Cytometry-Based Assay for Titrating Dengue Virus. *J of Clinical Microbiology* 2005;43(7):3267-3272.
20. Gupta A, Vakhare D, Chapalkar SR. Flow cytometry: an overview in optical system and application in biological studies. *European J of Biological Research* 2016;6(3):186-192.

21. Xue Y, Wilkes JG, Moskal TJ, Williams AJ, Cooper WM, Nayak R, Rafli F, Buzaty DA. Development of a Flow Cytometry-Based Method for Rapid Detection of Escherichia coli and Shigella Spp. Using an Oligonucleotide Probe. Plos One/Doi :10.1371/journal.pone.0150038.
22. Campbell JDM. Translating research flow cytometry assays for characterization of cellular therapeutics. J of Inflammation 2015;12(Suppl1):08.
23. Krause JR, PENCHANSKY L, CONTIS L, and KAPLAN SS. Flow Cytometry in the Diagnosis of Acute Leukemia. Am J Clin Pathol 1988;89(3):341-346.
24. Alvarez DF, Helm K, DeGregori J, Roederer M, and Majka S. Publishing flow cytometry data. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 2010;298:L127-L130.
25. Virgo PF, and Gibbs GJ. Flow Cytometry in Clinical pathology. Ann Clin Biochem 2012;49:17-28.
26. Mya HT, Campelo MD, Herrero SV, Diaz-Alvarez A, Bustos D, Vaquero LM, Perez JJ, Gonzalez V, Bastida JM, Garcia-Coca A, de Cabo E, Gonzales T, Puig N, Martin-Sancho A, Fernandez P, Davila J, Lopez AFM, Gonzales M, Del Cnizo C, and Vidriales MB. Peripheral Blood Analysis by Flow Cytometry for the Diagnosis of Type I Chronic Myelomonocytic Leukemia. Blood 2015;126:5248-5251.
27. Craig FE, and Foon KA. Flow Cytometric immunophenotyping for hematologic neoplasms. Blood 2008;111(8):3941-3967.
28. Jaye DL, Bray RA, Gebel HM, Harris WAC, and Waller EK. Translational Application Flow Cytometry in Clinical Practice. J Immunol 2012;188:4715-4719.
29. Shrestha S, Shrestha J, Pun CB, Pathak T, Bastola S, Bhatta R. Immunophenotypic study of acute leukemia by Flow Cytometry at BPKMCH. J of Pathology of Nepal 2013;3(5):345-350.
30. Betters DM. Use of Flow Cytoetry in Clinical Practice. J Adv Pract Oncol 2015;6 (5):435-440.

31. (https://www.google.com/url?sa=i&rct=j&q=&esrc=s&source=images&cd=&cad=rja&uact=8&ved=2ahUKewj7xc3zyZHdAhWTF30KHVaiAQ8Qjhx6BAgBEAM&url=https%3A%2F%2Fwww.researchgate.net%2Ffigure%2FStallion-spermatozoa-stained-with-fluorescence-isothiocynate-PNA-and-PI-imaged-by_fig5_238603148&psig=A0vVaw32Ci1f2_ft4dMciNqIlyxt&ust=1535608538741827)

Peni KS



Peni KS, dokter, mendapat gelar dokter umum dari Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro di Semarang tahun 1978. Ijasah Magister Sains dalam bidang Ilmu Kedokteran Dasar yang sekarang disebut Jurusan Biomedik diperolehnya dari Universitas Indonesia tahun 1988 dengan kepakaran struktur tubuh dan sel manusia. Sebagai sekretaris Asosiasi Flowcytometry Indonesia sejak 2005 hingga sekarang, Peni

juga mendaftarkannya sebagai anggota ISAC International Society of Analytical Cytometry, suatu perhimpunan Cytometry Dunia. Tahun 2005 dengan mewarnai mitochondria dengan MTG fluorochrome spesifik mitochondria, menapakkan bagaimana mewarnai organel sebuah sel hidup dan dan organel-organel lain dalam sel dapat dilihat dan dihitung dengan flowcytometer. PJ Praktikum mikroskop dalam modul sel dan genetika sejak 2005 dan sebagai koordinator pendidikan Departemen Fisika 2004-2008 dan kemudian sebagai koordinator penelitian Departemen Fisika 2008-2018, Peni berkiprah dalam prevensi dan promosi kesehatan indigenous, spesifik dalam kondisi iklim lembab dan hangat khas hutan hujan tropis. Panas yang terperangkap oleh kelembaban relative tinggi dalam pengaruhnya terhadap manusia, jamur dan bakteri serta genetic, epigenetic, metabolomik menjadi andalan PPJJ (Program Pembelajaran Jarak Jauh) bagi kita semua. Tulisannya dalam jurnal makara kesehatan, cytometry research dan IJOEAR dapat mudah ditemukan di google scholar dan mendeley dengan nama Peni Kistijani Samsuria Mutalib (PKS Mutalib). Seminar dan kongres tentang Diabetes dan Hypertension awal yang dikenal sebagai Sindrom Metabolik tak pernah ditinggalkannya, khususnya dalam UCPs (*uncoupling protein*) peran thermodinamika mitokondria di *tropical rainforest area*. Berat dan tinggi badan memang menjadi topik skripsinya sejak SMA. Disertasi S3 di Universitas Airlangga tahun 1998 untuk memperoleh gelar Doktornya, berjudul: Tebal Lipat Lemak Subscapular lebih 22 mm sebagai baku emas atherosclerosis preklinik merepresentasikan UCP1 pada manusia sejak usia dini. Tingginya UCP1 pada

mitochondria menunjukkan metabolisme pembuatan ATP belok menjadi produk panas (termogenetik) tanpa adanya ATP sintase. Dalam kongres ke-5 Controversies to Consensus in Obesity, Diabetes and Hypertension (CODHy) proceeding, tercatat bagaimana Peni menghubungkan tingginya produk aflatoxin menstimulasi prevalence obesity, diabetes dan hipertensi dalam hubungannya dengan UCPs, prevalensi tinggi di Negara sedang berkembang. Kini Peni sedang mempersiapkan urin aflatoxin M1 sub-ppb untuk pelayanan public sebagai infrastruktur menurunkan beban masalah kesehatan kita. Paparan Aflatoxin erat memicu UCP-UCP sebagai antioxidant terhadap aflatoxin. Menurunnya UCP1 pada lemak subkutan subscapular merangsang peningkatan UCP3 pada otot skelet dan ketika UCP3 menurun, merangsang peningkatan UCP2 pada lemak abdominal (perut). Ketika UCP2 menurun, Diabetes menjadi jelas. Demikianlah perjalanan diabetes mellitus sejak usia dini yang tak terdiagnosis di usia dini hingga terdiagnosis diusia 30-40 tahunan. Lingkar pinggang yang menggambarkan tingginya UCP2 telah terlambat untuk memerangi Diabetes dan seluruh komplikasinya.

Indranila Kustarini Samsuria



Dr. dr. Indranila Kustarini S., SpPK(K) adalah staf pengajar pada program studi Patologi Klinik, Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro. Lahir di Semarang pada tanggal 12 Mei 1957.

Gelar kesarjanaan diperoleh pada tahun 1987 dari Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro, Gelar Keahlian Patologi Klinik diperoleh pada tahun 1997, memperoleh Keahlian Konsultan Nefrologi pada tahun 2001 dan gelar doktor diperoleh dari DIKK Universitas Diponegoro pada 2012.

Diterima sebagai dosen pada Fakultas Kedokteran UNDIP pada tahun 1987 dengan mengajar di Bagian Patologi Klinik mata kuliah ginjal-saluran kemih, anemia, endokrin metabolik, metodologi penelitian. Penelitian yang pernah dilakukan antara lain "Batu saluran kemih pengabdian berbasis riset" (2014). Anggota Ikatan Penulis Buku Perguruan Tinggi (IPB-PT) dan Ambassador Hydration. Buku yang diterbitkan antara lain Tes Fungsi Hati dan Transfusi Perioperatif.

Beliau mengemban tugas sebagai Kepala Himpunan Kimia Klinik cabang Semarang dari tahun 2006 dan pernah menjadi koordinator pendidikan hingga beberapa periode. Pengurus anggota PDS PatKlin, dan PPDS-1 dan PPDS-2 PK FK UNDIP sampai sekarang. Menjadi dokter penanggung jawab lapangan (DPL) KKN Tim 1 dan Tim 2 UNDIP Semarang tahun 2016 sampai sekarang.

Masrifan Djamil



Dr. dr. Masrifan Djamil, MPH, MMR adalah staf pengajar Fungsional pada Politeknik Kesehatan Kemenkes Semarang, Jurusan Analis. Lahir di Jepara, pada 25 Januari 1958, menikah dan memiliki 3 orang puter dan puteri.

Gelar kesarjanaan diperoleh pada Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro pada tahun 1982, Gelar Master of Public Health (MPH) diperoleh dari University of the Philippines (UP) Manila pada tahun 1990. Memperoleh gelar Magister Manajemen Rumah Sakit (MMR) di UGM pada 2003. Lulus Doktor dari Prodi Doktor Ilmu

Kedokteran/Kesehatan Program Pascasarjana FK UNDIP pada 2017.

Beliau pernah menjadi Kepala Puskesmas Madukara (1983-1987) dan Sigaluh (1987-1992), selain itu beberapa diantaranya pernah menjadi direktur RSUD dr. M Ashari Kabupaten Dati II Pemalang (1992-1997); Kepala Laboratorium Kesehatan Daerah Provinsi Jawa Tengah (1999-2001); Staf fungsional Dinas Kesehatan Provinsi Jawa Tengah (2009); Dirut RS Roemani Semarang (2008-2010); menjadi dosen pada Politeknik Kesehatan Kemenkes Semarang, Jurusan Gizat dan Jurusan Analis Kesehatan (2009-sekarang). Ketua Subbag Kajian HIV-AIDS UP2M Poltekes Kemenkes Semarang (2010-2014). Menjadi Surveyor Komisi Akreditasi RS (Nasional) 2015-sekarang.

Aktif dan berpengalaman menjadi anggota pada organisasi IDI Jawa Tengah; Pengurus IDI Banjarnegara; Pengurus PMI; pernah pula mengemban tugas menjadi Ketua IDI Cabang Banjarnegara (2002-2004); Ketua Perhimpunan Dokter Umum Indonesia (PDUIO) Cabang Jawa Tengah dan perhimpunan organisasi profesi di bawah IDI; Anggota Pengurus Besar IDI (PB IDI) 2015-2018; Pengurus Kolegium Dokter Indonesia (KDI) PB IDI 2016 - sekarang.

Penelitian yang pernah dilakukan antara lain menjadi peneliti pada Penelitian Penyakit Menular (ISPA, TB, Malaria dan Campak) di Banjarnegara (2004). Penelitian di bidang HIV-AIDS (2010-2013) dan penerima Disertation Research Grant dari Yayasan Institute Danone Indonesia.

DAFTAR INDEKS

A

Amplification, 12, 74
Atom, 14, 16, 38

B

Bintik Api, 27

C

Cytobuoy, 5, 6, 7, 38, 39, 74
Cytoclus, 5, 6, 7, 9, 38, 44, 74
Cytosence, 44
Cytosub, 38

D

Detektor, 1, 16, 22, 32, 34, 49
Double helix, 3, 11

E

Emisi, 12, 14, 15, 16, 19, 24, 34, 40, 42, 48, 50
Exitasi, 15, 22, 23, 74

F

Flowsitometri, 32, 34
Fluoresensi, 1, 4, 6, 11, 22, 23, 24, 27, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 62
Fluoropore, 16, 40
Forward scattered, 23, 74

H

Hidrofilik, 16
Hidrofobik, 16
Hukum Bragg, 3, 11

I

Instrumentasi, 6

K

Kristalografi, 1, 2, 11, 75
Konfokal 1, 12, 34

M

Mikroskop cahaya, 1, 2, 12, 20
Mikroskop confocal, 12, 75
Mikroskop electron, 1, 75
Mikroskop Fase Kontras, 10, 13
Mikroskop interferensi, 1, 11, 75
Mikroskop sinar Laser, 1

N

Nanocrystal, 16, 17
Nanometer, 11, 18
Nozzle, 22, 24, 44, 48, 49, 50

O

Optic, 1, 75
Optical bench, 23

P

Panjang gelombang, 1, 10, 14, 15, 16, 17, 19, 40

Q

Qdot, 14, 15, 17, 18, 19, 36, 75

R

Resolusi, 1, 2, 11, 12

S

Sel darah merah, 14, 75
sel darah putih, 24
Sel hewan, 14, 75
Sensor, 16, 49
Sideways, 8, 75

T

Teori Optik, 27

V

Virus, 14, 65, 76
Vortex, 32, 33, 58, 75