

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Leukemia Mieloid Akut (LMA) merupakan suatu penyakit keganasan dari sistem hematopoietik yang ditandai dengan transformasi neoplastik dari sel progenitor mieloid berupa proliferasi yang ekksesif dan gangguan diferensiasi yang menimbulkan hambatan maturasi dari seri mieloid. Oleh karena proses tersebut fungsi lain dari sel darah normal juga terganggu hingga menimbulkan gejala klinis dari leukemia. Bila tidak diobati, penyakit ini akan menyebabkan kematian secara cepat dalam waktu beberapa minggu sampai bulan sesudah diagnosis.¹

American Cancer Society (2017) di Georgia memperkirakan kasus baru leukemia pria dewasa sebanyak 6.290 orang (4%) dari 836.150 populasi dan angka mortalitas sebanyak 14.300 orang (4%). Begitu juga kasus baru wanita dewasa sebanyak 36.290 orang (3%) dan angka mortalitas sebanyak 10.200 orang (4%).² Globocan (2012), insidensi kejadian leukemia dewasa di dunia berkisar 7% dari 100.000 populasi dengan angka mortalitas 5% dari 100.000 populasi.³ Fey *et al* (2013), *European Society Medical Oncologi* (ESMO) (2013), insiden LMA sekitar 5-8/100.000 populasi dan meningkat pada usia >70 tahun sekitar 15-25/100.000 populasi/tahun.⁴ Rumah Sakit Kanker Dharmais (2012), insiden LMA sekitar 53,3% dari seluruh leukemia.⁵ Insiden LMA di RSUP Dr. M. Djamil Padang dari september 2016 hingga agustus 2017 berjumlah 92 pasien dan 32 pasien yang telah menjalani kemoterapi. Asputra H (2015) melakukan penelitian terhadap 25 pasien LMA di poliklinik rawat jalan dan Instalasi rawat inap bagian Penyakit Dalam RSUP

Dr. M. Djamil Padang serta RS swasta di kota Padang pada tahun 2014 didapatkan nilai rerata usia pasien LMA sekitar 39,5 tahun.⁶

Leukemia Mieloid Akut (LMA) merupakan penyakit keganasan darah yang sangat heterogen berdasarkan karakteristik biologis dan klinisnya. Diagnosis LMA ditegakkan berdasarkan manifestasi klinis, morfologi sel darah tepi dan sum-sum tulang, sitokimia, immunophenotyping, sitogenetik dan molekuler. LMA ditandai dengan ekspansi klonal sel *mieloblast* di sumsum tulang, darah atau jaringan, ditandai oleh $\geq 20\%$ *mieloblast* di sumsum tulang yang mana normalnya tidak ditemukan *blast* dalam sumsum tulang. Kejadian LMA memiliki manifestasi klinis seperti anemia, hipertropi gingiva, perdarahan serta laboratorium seperti leukositosis dan peningkatan *blast* $\geq 20\%$ terdapat dalam sumsum tulang. Leukosit terdapat dalam darah tepi ($/\text{mm}^3$) dapat diukur dengan alat Sysmex XT 2000i. Saat ini dikenal dua sistem klasifikasi subtipe LMA yaitu klasifikasi *French-American-British* (FAB) dan klasifikasi terbaru WHO. Selain itu gejala klinisnya yang bervariasi dengan abnormalitas genetik secara spesifik teridentifikasi pada LMA memiliki hubungan dengan prognosis yang spesifik.⁷

Tatalaksana LMA dapat dicapai dengan regimen kemoterapi, yaitu kemoterapi dosis tinggi dengan dukungan transplantasi sumsum tulang serta terapi suportif yang lebih baik. Standar terapi LMA berdasarkan kemoterapi sitotoksik, pasien diberikan terapi induksi yang diikuti dengan konsolidasi atau transplantasi sum-sum tulang. Standar terapi induksi dikenal regimen 3-7 (daunorubisin dan sitarabin). Kira-kira 60-80% pasien akan mengalami respon komplit dengan regimen ini, namun terapi agresif ini akan menyebabkan neutropenia dan trombositopenia dan tingginya kejadian febril neutropenia serta sepsis yang mengakibatkan tingginya angka kematian pasien LMA. Mayoritas pasien LMA tidak dapat diselamatkan

dengan menggunakan standar kemoterapi terkini, bahkan dengan performa status yang baik serta tidak adanya faktor komorbid yang berat. Pemeriksaan imunofenotiping & sitogenetik akan membantumengidentifikasi kelompok pasien yang memiliki prognosis yang baik dengan kemoterapi intensif.^{1,6,7}

Perkembangan mengenai sel dan biologi molekular saat initelah merevolusi pemahaman kita tentang hematopoeisis. Proses karsinogenik/ leukomogenik dapat memicu terjadinya berbagai mutasi gen. Adanya mutasi gen akan mempengaruhi keseimbangan proliferasi, diferensiasi, survival, DNA repair dan apoptosis yang merupakan suatu proses selular yang mendasari perkembangan sel progenitor hematopoietik. Pada LMA terdapat kelainan heterogen pada sel progenitor hematopoietik dan telah diidentifikasi mempengaruhi keseimbangan tersebut. Selama beberapa tahun terakhir, banyak studimenyimpulkan bahwa mutasi genetik menyebabkan terjadinya LMA melalui proses leukemogenesis.^{2,7}

Hematopoesis merupakan proses stem cells hematopoietik dari sel progenitor yang berdiferensiasi menjadi sel-sel darah berbagai tingkat perkembangan serta melibatkan interaksi faktor transkripsi yang kompleks yang memodulasi ekspresi gen dan mediasi jalur proliferasi dan diferensiasi. Meskipun banyak kontrol yang mengatur hematopoesis, mutasi gen regulator mampu mempromosikan leukemogenesis. Pemeriksaan genetik yang sudah establish diklasifikasikan oleh WHO 2008 ke dalam hematopoietik neoplasma untuk menilai diagnosis & prognosis pada LMA diantaranya gen *NPM1*, *FLT3*, *CEBPA* dan *cKIT*.⁸

Nucleophosmin-1 adalah protein multifungsi yang terlibat dalam berbagai aktivitas selular, diantaranya biogenesis ribosom, stabilitas genom, dan mengatur transkripsi serta modulasi faktor-faktor transkripsi supresi tumor. Gen *NPM1* terletak pada kromosom nomor 5 lengan panjang (q) lokus 23 (5q23) yang terdiri

atas 12 ekson. Gen *NPM1* mengkode *Nucleophosmin-1* yang merupakan fosfoprotein nuklear yang tersedia dalam jumlah melimpah di dalam sel dan secara konstan berpindah antara nukleus dan sitoplasma. Gen *NPM1* merupakan salah satu target perubahan genetik yang paling sering terjadi pada keganasan hematopoetik. Kelainan genetik pada gen *NPM1* ditandai dengan translokasi kromosom pada seri mieloid sehingga menimbulkan mutasi pada LMA. Insidensi mutasi *NPM1* meningkat berdasarkan usia, 2,1%-6,5% pada LMA anak-anak dan 35%-60% pada LMA dewasa. Hal tersebut menunjukkan bahwa insidensi LMA lebih tinggi pada dewasa dari pada anak-anak. Mutasi *NPM1* pada LMA sering mengalami perubahan genetik terutama pada ekson 12 sekitar (98%).⁹

Kerusakan *NPM1* melalui proses mutasi gen tersebut dapat berdampak pada overekspresi mutasi gen *NPM1*. Gen *NPM1* yang mengalami mutasi tidak dapat berfungsi secara normal sebagai *binding partner* protein transporter yang mengarah kepada hipotesis bahwa mutasi *NPM1* mungkin menjadi kejadian awal dalam leukemogenesis. Sejumlah studi menunjukkan bahwa pasien dengan mutasi *NPM1* memiliki prognosis yang baik ditandai adanya overekspresi *NPM1* pada LMA sehingga respon baik terhadap terapi. Mutasi ini juga dapat digunakan sebagai penanda untuk mendeteksi *minimal residual disease* (MRD). Oleh karena itu, analisis mutasi gen *NPM1* muncul sebagai langkah baru dalam prognosis pasien LMA.^{10,11}

Leukemia Mieloid Akut dengan mutasi *NPM1* telah diklasifikasikan ke dalam neoplasma hematopoetik oleh WHO 2008. Penapisan untuk mutasi *NPM1* pada pasien LMA saat ini direkomendasikan untuk diagnosis genetik rutin karena beberapa alasan, diantaranya kelainan tersebut merepresentasikan abnormalitas genetik yang paling sering diketahui pada LMA, kelainan tersebut memberikan

prognostik yang signifikan karena mutasi *NPM1* menunjukkan pasien dengan respon yang lebih baik terhadap kemoterapi dan mutasi *NPM1* merepresentasikan target yang ideal untuk penentuan MRD. Beberapa metode telah dikembangkan untuk mendeteksi mutasi gen *NPM1*, antara lain **quantitative real time PCR (qRT-PCR)** dan *DNA sequencing*.^{12,13}

Insidensi mutasi *NPM1* pada LMA berdasarkan penelitian di negara-negara Eropa telah banyak dilakukan, seperti Verhaak *et al*, (2005) menemukan kejadian mutasi *NPM1* pada LMA sebesar 26%.¹⁰ Chou *et al*, (2006), meneliti adanya mutasi pada gen *NPM1* pasien sebesar 40,3%.¹⁴ Penelitian oleh Yan *et al* (2007) menemukan adanya mutasi *NPM1* sebesar (41,1%).¹⁵ Heath *et al* (2017), *NPM1* merupakan mutasi gen yang sering terjadi pada LMA. Mutasi gen *NPM1* pada LMA sudah diklasifikasi WHO dan establish untuk menilai risiko prognosis baik pada LMA. Mutasi gen *NPM1* yang umumnya terjadi pada orang dewasa dengan usia rerata 46-58 tahun dibandingkan dengan *NPM1* 39-47 tahun. Mutasi gen *NPM1* pada wanita lebih sering dari pria. Mutasi gen *NPM1* pada LMA kariotip normal terjadi sekitar 48%. Pasien yang mengalami mutasi gen *NPM1* akan mengalami remisi komplet setelah mendapatkan kemoterapi. Kasus relaps timbul pada LMA mungkin disebabkan oleh late mutasi oleh sel preleukemia. Dengan demikian timbulnya relaps dapat mewakili suatu LMA sekunder. Kehadiran dari overekspresi mutasi gen *NPM1* memiliki hubungan yang kuat dengan jumlah leukosit, *blast* serta hipertropi gingiva.¹⁶

Davodi *et al* (2015), ekspresi *NPM1* berkorelasi kuat dengan kejadian hipertropi gingiva, peningkatan jumlah leukosit, jumlah *blast* yang sering terdapat pada *leukemia mielomonositik akut* (M4) dan *leukemia monositik akut* (M5). Mutasi gen *NPM1* didapatkan rerata umur 35 tahun. Gen *NPM1* merupakan biomarker

untuk prognosis baik pada pasien LMA, karena jika meningkat akan memiliki remisi komplit setelah dilakukan kemoterapi.¹⁷ Yacoub *et al* (2016) mengidentifikasi manifestasi klinis hipertropi gingiva yang merupakan pemeriksaan penting untuk menduga suatu LMA, karena secara signifikan akan menurunkan angka morbiditas pada awal diagnosis dan terapi. Pada penelitian ini hipertropi gingiva sering terjadi sekitar 55%.¹⁸ Hasan *et al* (2015), LMA mengalami hipertropi gingiva disebabkan oleh infiltrasi sel leukemia disertai trombositopenia dan neutropenia. Komplikasi LMA akan menyebabkan hipertropi gingiva sebesar 66,7%. Staffor *et al* (2015), LMA sering mengalami hipertropi gingiva positif 65%. Huan *et al* (2014) menemukan hipertropi gingiva sebesar 70%.¹⁹

Ivey *et al* (2016) meneliti 52 pasien LMA yang mengalami mutasi gen *NPM1* di sitoplasma sekitar 98% pasien. Mutasi *NPM1* terjadi pada ekson 12 dari gen *NPM1*, sehingga kebanyakan penelitian terbatas pada ekson 12.¹⁶ Yeon *et al* (2016), *NPM1* merupakan penanda marker yang baik untuk menilai status klinis dan memprediksi prognosis pasien LMA. Mutasi *NPM1* terjadi sekitar 39% pada pasien LMA yang diperiksa menggunakan *qRT-PCR*. Pasien mengalami remisi komplit 81,3% setelah menjalani kemoterapi.²⁰

Quan *et al* (2015), meneliti mutasi gen *NPM1* pada 37 pasien dari 100 pasien LMA dengan menggunakan *qRT-PCR*. Gen *NPM1* dapat dideteksi di sitoplasma sekitar 1×10^7 *copies/ml*. Pada penelitian ini terjadi overekspresi *NPM1* ditemukan dalam plasmaber kisar antara 0.35×10^8 *copies/ml* hingga 6.0×10^8 *copies/ml* dari 37 pasien LMA. Kadar mutasi gen *NPM1* pada LMA tipe M2 (12 pasien), M4 (9 pasien), M5 (14 pasien) masing-masing 1.35×10^8 (0.76×10^8 , 1.91×10^8) *copies/ml*, 1.81×10^8 (1.47×10^8 , 2.2×10^8) *copies/ml*, 2.50×10^8 (2.42×10^8 , $3.03 \times$

10^8) *copies/ml*. Jadi pada penelitian ini didapatkan ekspresi *NPM1* tinggi LMA tipe M5, M4 & M2 dan tidak ditemukan mutasi pada M0, M1 & M6.²¹

Penelitian Akbar *et al* (2013) menemukan ekspresi *NPM1* pada LMA dewasa di Rumah Sakit Cipto Mangunkusumo (RSCM) dan Rumah Sakit Kanker Dharmais (RSKD). Hasil penelitian didapatkan 13 sampel (39,39%) dari 33 sampel yang terdeteksi mengalami overekspresi *NPM1*. Penelitiannya tersebut bertujuan untuk mengetahui karakteristik mutasi *NPM1* dan frekuensi kejadian mutasi serta benar atau tidak bahwa mutasi tersebut ditemukan pada pasien LMA di RSCM dan RSKD.²²

Insidensi dan prevalensi kejadian LMA akhir-akhir ini memiliki angka morbiditas, mortalitas yang tinggi dari berbagai literatur dan penelitian. Sehingga LMA dikategorikan memiliki prognosis yang buruk. Namun untuk mengatasi hal tersebut, banyak peneliti berusaha memeriksa berbagai gen yang berperan untuk terjadinya LMA serta menilai diagnostik dan prognostik. WHO 2008 telah menyatakan bahwa gen yang establish sebagai penanda marker genetik untuk LMA diantaranya adalah *NPM1*, *FLT3*, *cKIT* dan *CEPBA* serta kemudian di revisi oleh WHO 2016. Gen *NPM1* paling sering bermutasi sekitar 35-60% pada LMA dan memiliki prognosis favorable (prognosis baik). Gen *FLT3* memiliki prognosis unfavorable (prognosis buruk), sedangkan *cKIT* memiliki prognosis sedang. Dengan berkembangnya ilmu biologi molekuler saat ini, merasa perlu kita untuk menekan angka morbiditas dan mortalitas pasien LMA dengan melakukan pemeriksaan gen pada LMA yang bernilai prognosis. Berdasarkan latar belakang diatas, peneliti berkeinginan untuk melakukan penelitian perihal ekspresi *NPM1* pada pasien LMA dan hubungannya dengan jumlah leukosit, jumlah *blast*, dan hipertropi gingiva di RSUP Dr. M. Djamil Padang. Sehingga dapat membantu kita

dalam mendiagnosis dan menilai prognosis yang selanjutnya akan memberikan pertimbangan bagi klinisi untuk memberikan kemoterapi.

1.2. Rumusan Masalah

Apakah terdapat overekspresi *NPM1* pada pasien LMA dan bagaimana hubungannya dengan jumlah leukosit, jumlah *blast*, dan hipertropi gingiva di RSUP Dr. M. Djamil Padang ?

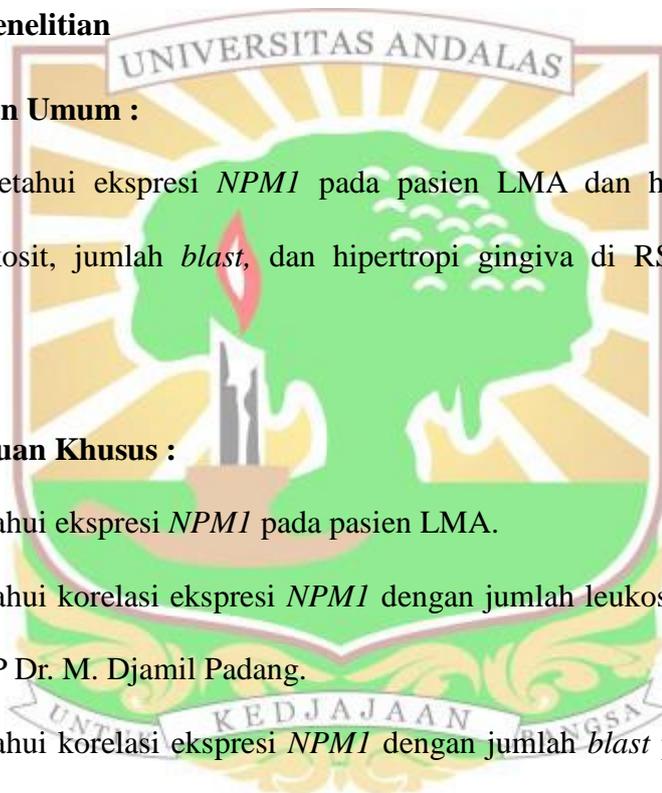
1.3. Tujuan Penelitian

1.3.1. Tujuan Umum :

Mengetahui ekspresi *NPM1* pada pasien LMA dan hubungannya dengan jumlah leukosit, jumlah *blast*, dan hipertropi gingiva di RSUP Dr. M. Djamil Padang.

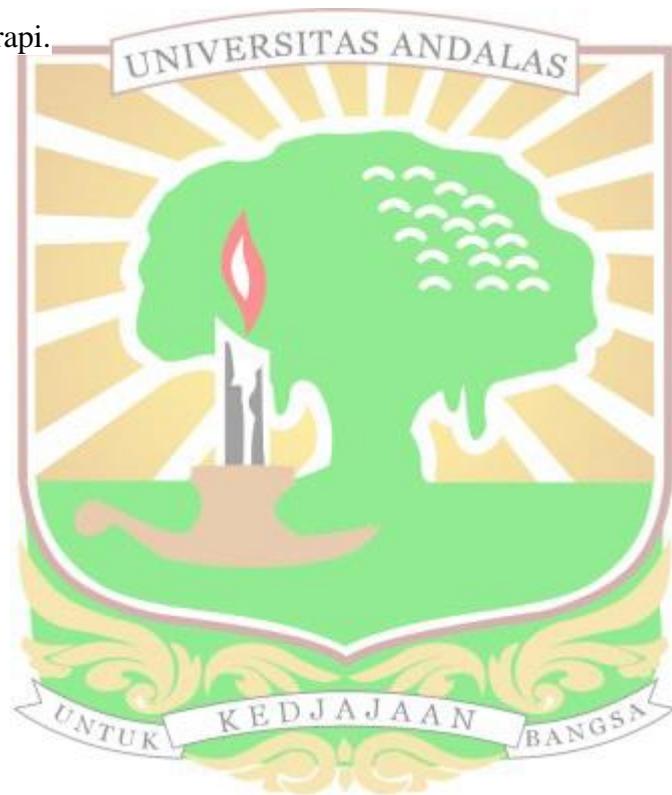
1.3.2. Tujuan Khusus :

1. Mengetahui ekspresi *NPM1* pada pasien LMA.
2. Mengetahui korelasi ekspresi *NPM1* dengan jumlah leukosit pada pasien LMA di RSUP Dr. M. Djamil Padang.
3. Mengetahui korelasi ekspresi *NPM1* dengan jumlah *blast* pada pasien LMA di RSUP Dr. M. Djamil Padang.
4. Mengetahui perbedaan rerata ekspresi *NPM1* pada pasien LMA dengan hipertropi gingiva positif dan negatif di RSUP Dr. M. Djamil Padang.



1.4. Manfaat Penelitian

1. Penelitian ini diharapkan dapat memberikan sumbangan terhadap ilmu pengetahuan perihal ekspresi *NPM1* pada pasien LMA di RSUP Dr. M. Djamil Padang serta hubungannya dengan jumlah leukosit, jumlah *blast* dan hipertropi gingiva.
2. Penelitian ini dapat membantu kita dalam menilai prognosis pasien LMA yang selanjutnya akan memberikan pertimbangan bagi klinisi untuk memberikan kemoterapi.



BAB 2

TINJAUAN KEPUSTAKAAN

2.1. *Leukemia Mieloid Akut (LMA)*

2.1.1. Etiologi

Penyebab utama dari LMA belum diketahui secara pasti. Namun terdapat beberapa faktor yang berhubungan dengan kejadian LMA diantaranya, faktor genetik seperti kelainan kariotipe, kelainan hematologi, paparan lingkungan, paparan obat-obatan, paparan radiasi, paparan senyawa kimia seperti benzena, rokok, pengobatan dengan kemoterapi atau obat yang melemahkan sistem imun yang jelas berkaitan dengan patogenesis dari LMA.^{1,23}

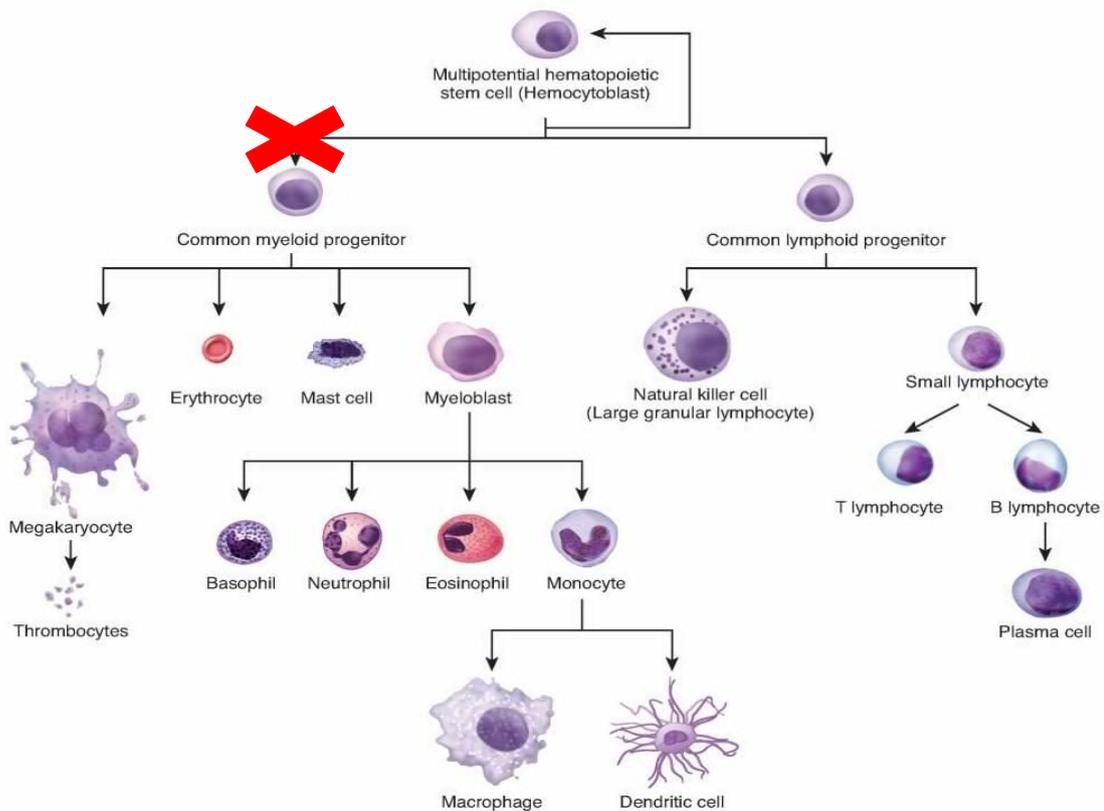
2.1.2. Epidemiologi

Leukemia Mieloid Akut merupakan golongan penyakit yang ditandai dengan kelainan imunofenotip dan heterogenitas genetik, yang didefinisikan sebagai proliferasi sel klonal imatur dari progenitor hematopoetik dengan diferensiasi mieloid (*myeloblast*) di sumsum tulang, darah perifer atau jaringan ekstrainternal. Secara epidemiologi, LMA menunjukkan distribusi tertinggi di kelompok usia muda. Pada usia yang lebih tua LMA terjadi sekitar 25% dari semua kasus leukemia.^{1,23,24}

2.1.3. Patogenesis

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

trombositopenia). Anemia dapat menyebabkan pasien mudah lelah dan pada kasus yang lebih berat bisa terjadi sesak nafas, trombositopenia yang menyebabkan tanda-tanda perdarahan, leukopenia yang menyebabkan pasien akan rentan terhadap infeksi, termasuk infeksi oportunistik dari flora bakteri normal yang ada di dalam tubuh manusia. Selain itu sel-sel *blast* yang terbentuk juga memiliki kemampuan untuk migrasi keluar sumsum tulang dan berinfiltrasi ke organ-organ lain seperti kulit, tulang, jaringan lunak dan sistem saraf pusat dan merusak organ-organ tersebut dengan segala akibatnya.^{1,23,24}



Gambar. 2.1. Stem Cell Hematopoietic²⁴

2.1.4. Klasifikasi

Leukemia Mieloid Akut diklasifikasikan berdasarkan sistem klasifikasi *French-American-British* (FAB) dengan kriteria terutama morfologi dan fenotip/sitokimia. Dengan FAB, ada 8 sub tipe LMA (FAB M0 sampai M7). (Tabel 2.1) Klasifikasi tersebut kemudian digantikan dengan klasifikasi menurut *World Health Organization* (WHO) 2008 dengan kriteria abnormalitas genetika atau genetika molekuler (Tabel 2.2).²⁴

Tabel.2.1 Klasifikasi LMA berdasarkan FAB²⁴

Subtipe	Diagnosis
M0	<i>Leukemia Mieloid Akut tidak terdiferensiasi</i>
M1	<i>Leukemia Mieloid Akut diferensiasi sedikit</i>
M2	<i>Leukemia Mieloid Akut terdiferensiasi</i>
M3	<i>Leukemia Promielositik Akut</i>
M4	<i>Leukemia Mielomonositik Akut</i>
M5	<i>Leukemia Monositik Akut</i>
M6	<i>Leukemia Eritroid Akut</i>
M7	<i>Leukemia Megakariositik Akut</i>

Klasifikasi keganasan haematopoietik terakhir kali diperbaharui pada tahun 2008. Sejak itu banyak kemajuan dalam mengidentifikasi biomarker yang terkait dengan beberapa neoplasma myeloid dan leukemia akut. Sebagian besar berasal dari analisis ekspresi gen dan *next generation sequencing* (NGS). Oleh karena itu, perlunya untuk merevisi klasifikasi ini dan dipublikasikan pada tahun 2016. Edisi revisi WHO 2016 merupakan revisi dari klasifikasi sebelumnya yang menggabungkan data klinis, prognostik, morfologi, imunofenotip dan genetik baru.¹

Tabel.2.2 Klasifikasi LMA menurut WHO 2016¹

Kategori
<i>AML with recurrent genetic abnormalities</i> AML with t(8;21)(q22;q22); RUNX1-RUNX1T1 AML with inv(16)(p13.1q22) atau t(16;16)(p13.1;q22); CBFB-MYH11 APL with t(15;17)(q22;q12); PML-RARA AML with t(9;11)(p22;q23); MLLT3-MLL AML with t(6;9)(p23;q34); DEK-NUP214 AML with inv(3)(q21q26.2) atau t(3;3)(q21;q26.2); RPN1-EVI1 AML (megakaryoblastic) with t(1;22)(p13;q13); RBM15-MKL1 AML with mutated NPM1 AML with mutated CEBPA
<i>AML with myelodysplasia-related changes</i>
<i>Therapy-related myeloid neoplasms</i>
AML, not otherwise specified (NOS) AML with minimal differentiation AML without maturation AML with maturation Acute myelomonocytic leukemia Acute monoblastic/monocytic leukemia Acute erythroid leukemia Acute megakaryoblastic leukemia Acute basophilic leukemia Acute panmyelosis with myelofibrosis
<i>Myeloid sarcoma</i>
Myeloid proliferations related to Down syndrome Transient abnormal myelopoiesis Myeloid leukemia associated with Down syndrome
<i>Blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm</i>
Acute leukemias of ambiguous lineage Acute undifferentiated leukemia Mixed phenotype acute leukemia with t(9;22)(q34;q11.2); BCR-ABL1 Mixed phenotype acute leukemia with t(11q23); MLL rearranged Mixed phenotype acute leukemia, B/myeloid, NOS Mixed phenotype acute leukemia, T/myeloid, NOS Natural killer cell lymphoblastic leukemia/lymphoma

2.1.5. Diagnosis

Pendekatan diagnostik pada leukemia akut telah terjadi perubahan yang signifikan selama 20-30 tahun terakhir. Kemajuan ini mencerminkan pemahaman tentang perubahan genetik dan molekuler yang berkontribusi pada leukemogenesis. Secara garis besar diagnosis kerja LMA yaitu berdasarkan pemeriksaan sumsum tulang pada pasien yang dicurigai berdasarkan klinis dan laboratorium, pemeriksaan morfologi, sitokimia dan immunofenotip. Setelah itu dapat dilakukan pemeriksaan lanjutan berupa pemeriksaan sitogenetik, molekuler, namun membutuhkan waktu yang agak lama, tetapi hasil yang diperoleh dapat digunakan untuk klasifikasi dan diagnosis definitif penyakit.^{1,23,24,27}

2.1.6. Manifestasi Klinis

Manifestasi klinis LMA sering tidak spesifik dan biasanya terkait dengan infiltrasi leukemik ke sumsum tulang dengan hasil akhir sitopenia. Tanda dan gejala utama LMA berupa rasa lelah, perdarahan dan infeksi yang disebabkan sindroma kegagalan sumsum tulang. Perdarahan biasanya terjadi dalam bentuk purpura, petekie, epistaksis, hipertropi gingiva dan perdarahan gusi. Perdarahan yang lebih berat jarang terjadi kecuali pada kasus yang disertai dengan DIC. Kasus DIC ini paling sering dijumpai pada kasus LMA tipe M3.^{1,23,24,27}

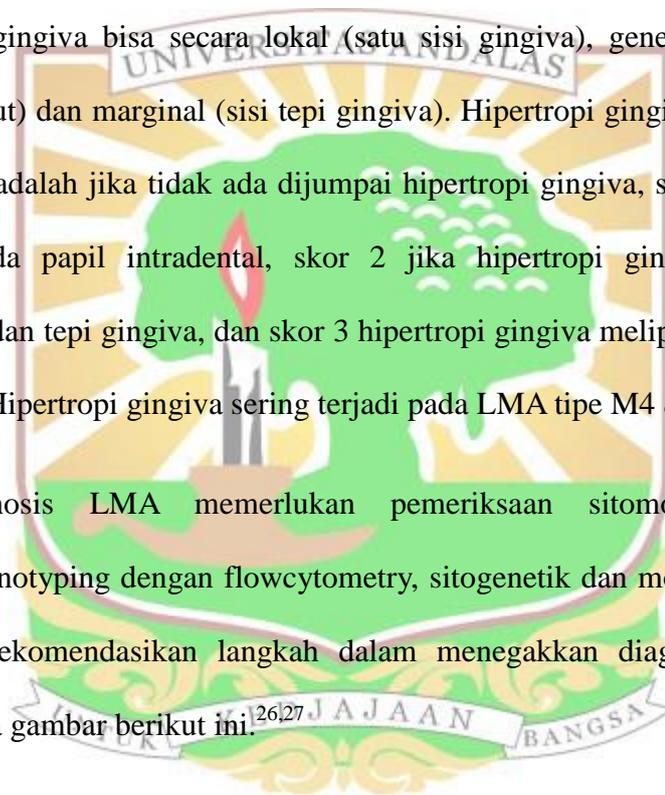
Penelitian Hasserjein *et al* (2014) pada 571 pasien LMA di Boston Amerika, didapatkan 142 pasien LMA dengan *blast* sekitar 20-29 % dan 429 pasien dengan *blast* >30%. Leukosit >30.000/mm³ sekitar >50%, sisanya leukosit <30.000/mm³. *Blast* merupakan sel muda yang sering membelah dan pada LMA akan terjadinya gangguan maturasi ke sel matang. Jika ditemukan pada sediaan gambaran darah tepi berupa anemia, pansitopenia, neutropenia, maka menjelaskan bahwa belum terjadi infiltrasi sel *blast* ke perifer. Keadaan tersebut biasanya ditemukan pada leukosit normal atau menurun, hal ini dinyatakan sebagai suatu leukemia aleukemik. Apabila *blast* ditemukan 5-19% di perifer, menandakan bahwa pada aspirasi sumsum tulang akan ditemukan *blast* >20%.^{25,27}

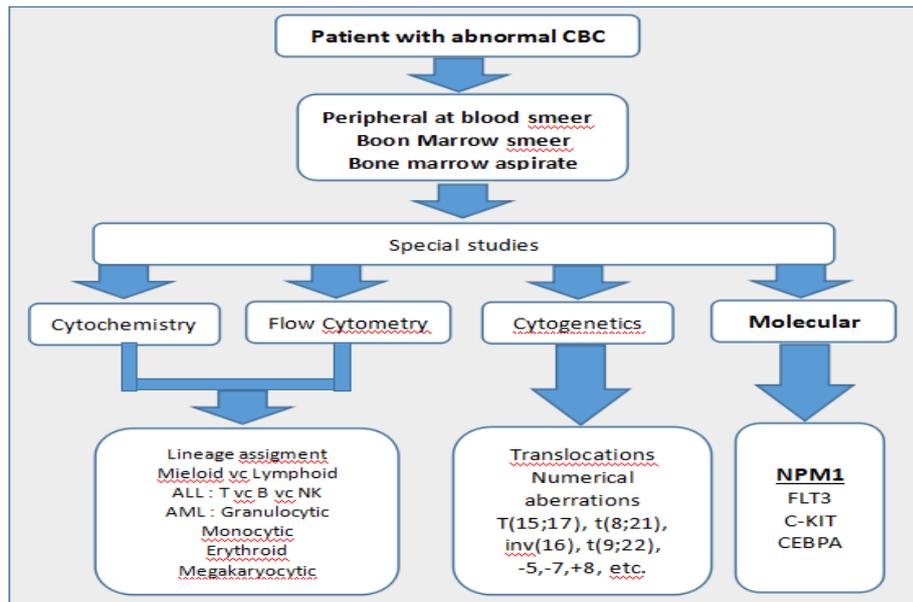
Leukositosis terjadi pada lebih dari 50% kasus LMA biasanya berkisar antara 15.000-50000/mm³. Namun sekitar 15% pasien mempunyai angka leukosit yang normal dan sekitar 35% pasien mengalami neutropenia, meskipun demikian sel *blast* (sel muda) dalam jumlah yang signifikan dalam sel-sel darah tepi akan ditemukan pada lebih 85% kasus LMA. Pada pasien dengan angka leukosit yang sangat tinggi (>100.000/mm³) sering mengalami leukostasis, yaitu terjadinya gumpalan leukosit yang menyumbat aliran pembuluh darah vena maupun arteri. Gejala leukostasis

sangat bervariasi, tergantung lokasi sumbatannya. Infiltrasi sel-sel blast akan menyebabkan tanda/ gejala yang bervariasi tergantung organ yang diinfiltrasi.^{2,26}

Hipertropi gingiva merupakan komplikasi oral yang sering terjadi pada LMA, dimana jaringan gingiva pada penderita LMA lebih rentan terhadap infiltrasi sel leukemia yang menyebabkan keluarnya komponen molekul adhesi endotelial sehingga infiltrasi leukosit semakin meningkat. Hipertropi gingiva adalah pembesaran jaringan gingiva diantara gigi dan atau leher gigi secara berlebihan. Hipertropi gingiva bisa secara lokal (satu sisi gingiva), general (seluruh gingiva rongga mulut) dan marginal (sisi tepi gingiva). Hipertropi gingiva bisa juga di skor; bila skor 0 adalah jika tidak ada dijumpai hipertropi gingiva, skor 1 jika hipertropi gingiva pada papil intradental, skor 2 jika hipertropi gingiva meliputi papil intradental dan tepi gingiva, dan skor 3 hipertropi gingiva meliputi 3/4 mahkota gigi atau lebih. Hipertropi gingiva sering terjadi pada LMA tipe M4 & M5.^{18,19}

Diagnosis LMA memerlukan pemeriksaan sitomorfologi, sitokimia, immunophenotyping dengan flowcytometry, sitogenetik dan molekuler. Zuo Z *et al* (2009) merekomendasikan langkah dalam menegakkan diagnosis LMA seperti terlihat pada gambar berikut ini.^{26,27}





Gambar. 2.2. Pemeriksaan sitokimia, sitogenetik dan molekuler pasien LMA²⁶

2.1.7. Sitomorfologi & Sitogenetik

Aspirasi sumsum tulang merupakan bagian dari pemeriksaan rutin untuk diagnosis LMA. Pulasan darah dan sumsum tulang diperiksa dengan pengecatan Wright-Giemsa. Untuk hasil yang akurat, diperlukan setidaknya 500 sel nucleated dari sumsum tulang dan 200 sel darah putih dari perifer. Hitung *blast* sumsum tulang atau darah $\geq 20\%$ diperlukan untuk diagnosis LMA, kecuali LMA dengan t(15;17), t(8;21), inv(16), atau t(16;16) yang didiagnosis terlepas dari persentase *blast*.^{6,19,27}

Berdasarkan pemeriksaan morfologi sel dan pengecatan sitokimia gabungan ahli hematologi Perancis, Amerika dan Inggris menetapkan klasifikasi LMA yang terdiri dari 8 subtipe (M0 sampai M7), klasifikasi ini dikenal dengan nama klasifikasi FAB. Pengecatan sitokima yang penting untuk LMA adalah *Sudan Black B* (SBB) dan *Mieloperoksidase* (MPO). Pada tabel berikut dapat dilihat kesepadanan diagnosis LMA berdasarkan klasifikasi FAB dan analisis sitogenetik.²⁴

Tabel. 2.3. Sitomorfologi dan sitogenetik LMA²⁴

Subtipe FAB	Nama Umum (%kasus)	Translokasi dan penyusunan kembali (%kasus)	Gen yang terlibat
M0	Leukemia mieloid akut tanpa diferensiasi (5%)	inv(3q26) dan t(3;3) (1%)	<i>EV11</i>
M1	Leukemia mieloid akut diferensiasi minimal (5%)	-	-
M2	Leukemia mieloid akut dengan maturasi (25-30%)	t(8;21) (40%), t(6;9) (1%)	<i>FLT3 AML1-ETO, DEK-CAN</i>
M3	Leukemia promielositik akut (5-10%)	t(15;17) (98%), t(11;17) (1%)	<i>PML-RARα</i>
M4	Leukemia mielomonositik akut (20%)	11q23(20%), inv(3q26) (3%)	<i>NPML, c-KIT, FLT3, MLL</i>
M5	Leukemia monositik akut (9-15%)	11q23 (20%), t(8,16) (2%)	<i>NPML, cKIT, CEBPA</i>
M6	Eritroleukemia (3-5%)	-	-
M7	Leukemia megakariositik akut (3-12%)	T(1,22) (5%)	-

2.1.8. Immunophenotyping

Immunophenotyping diperiksa secara flowcytometry yang merupakan penanda dan lebih bersifat konfirmasi diagnosis dari sitomorfologi. Pemeriksaan immunophenotyping sering digunakan untuk menentukan tipe sel leukemia berdasarkan antigen permukaan. Kriteria yang digunakan adalah $\geq 20\%$ sel leukemik mengekspresikan penanda (untuk sebagian besar penanda).²⁶

Tabel. 2.4. Immunophenotyping LMA

Expression of markers for diagnoses	
Diagnosis of acute myeloid leukemia (AML)*	
Precursor stage	CD34, CD38, CD117, CD133, HLA-DR
Granulocytic markers	CD13, CD15, CD16, CD33, CD65, cytoplasmic myeloperoxidase (cMPO)
Monocytic markers	Nonspecific esterase (NSE), CD11c, CD14, CD64, lysozyme, CD4, CD11b, CD36, NG2 homologue†
Megakaryocytic markers	CD41 (glycoprotein IIb/IIIa), CD61 (glycoprotein IIIa), CD42 (glycoprotein 1b)
Erythroid marker	CD235a (glycophorin A)
Diagnosis of mixed phenotype acute leukemia (MPAL)†	
Myeloid lineage	MPO or evidence of monocytic differentiation (at least 2 of the following: NSE, CD11c, CD14, CD64, lysozyme)
B-lineage	CD19 (strong) with at least one of the following: CD79a, cCD22, CD10, or CD19 (weak) with at least 2 of the following: CD79a, cCD22, CD10
T-lineage	cCD3, or surface CD3

Immunophenotyping ini diperiksa dengan flowcytometry yang merupakan penanda dan lebih bersifat konfirmasi diagnosis dari sitomorfologi.²⁶

2.1.9. Kelompok prognosis berdasarkan sitogenetik dan molekuler

Selain sistem FAB dan WHO, penanda sitogenetik dan molekuler juga berperan dalam menentukan prognosis pasien LMA. Berdasarkan hasil sitogenetik dan molekuler, kelompok prognostik dibagi menjadi tiga kelompok risiko: baik, sedang dan buruk. Prognosis baik dari sitogenetik ditandai dengan adanya inv (16), t(16;16), t(8;21), dan t(15;17) dan dari molekuler adanya mutasi *NPM1*. Sedangkan kelompok prognosis buruk dari sitogenetik ditandai adanya adanya kariotipe yang kompleks, delesi kromosom 5, del(5q), 7q, 11q23, t(6;9), dan t(9;22) serta penanda prognosis buruk dari molekuler terdapatnya mutasi *FLT3*. Resiko sedang dari pemeriksaan molekuler ditandai adanya mutasi *cKIT*.^{28,29}

Tabel. 2.5 Risiko LMA dari profil sitogenetika dan molekuler²⁸

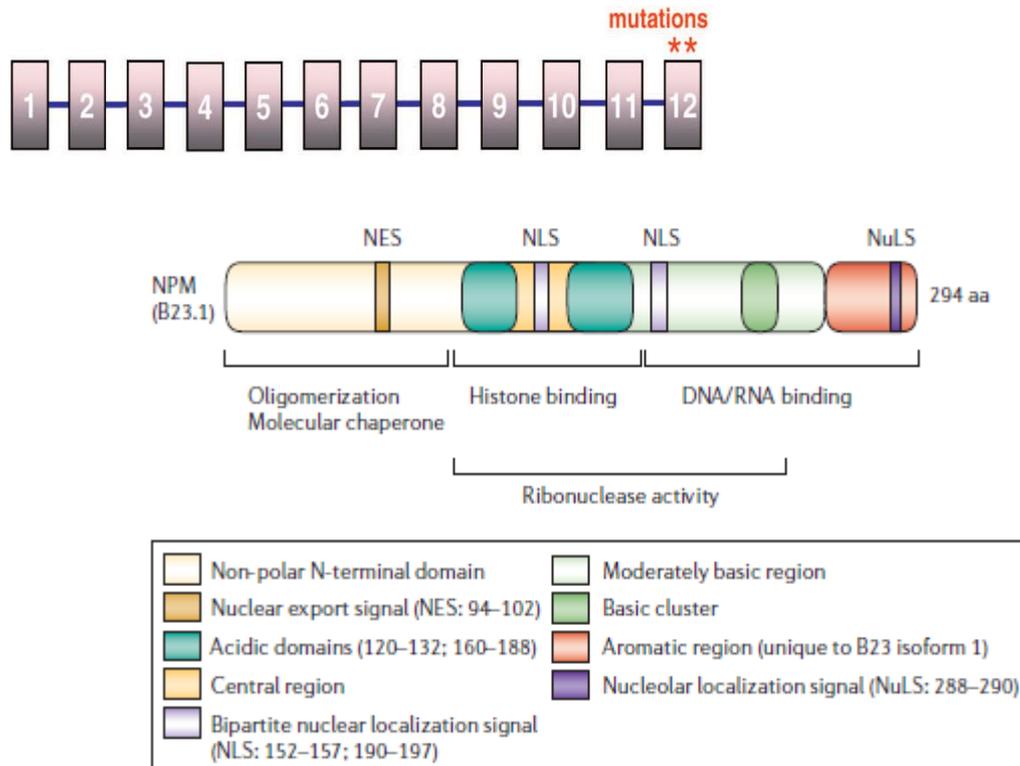
Risk Status	Cytogenetics	Molecular
Favorable	Inv (16) or t(16;16), t(8;21), or t(15;17)	<i>NPM1 mutation</i> CEBPA mutation
Intermediate	Normal cytogenetics t(9;11) Other non-defined	C-KIT mutation
Poor	Complex (≥ 3 clonal abnormalities) Monosomal karyotype -5,5q-,7q- 11q23- non t(9;11), t(6;9), t(9;22)	FLT3 mutation

2.2. *Nucleophosmin-1* (NPM1)

2.2.1. Struktur *Nucleophosmin-1* (NPM1)

Nucleophosmin-1 (NPM1) juga dikenal sebagai numatrin atau B23, merupakan anggota dari keluarga *NPM* yang secara langsung berkaitan dengan perkembangan kanker pada manusia. *Nucleophosmin-1* terletak pada kromosom nomor 5 lengan panjang (q) lokus 23 (5q23) dan terdiri atas 12 ekson. *Nucleophosmin-1* merupakan protein dengan berat molekul 37kD yang terdiri atas

294 asam amino dan memiliki rantai polipeptida *NPM1* dengan struktur modular, mengandung motif-motif sekuen yang berbeda. Berbagai domain fungsional telah diidentifikasi di dalam protein yang terletak pada segmen-segmen yang secara umum berdiri sendiri namun saling melengkapi (Gambar 2.3.).^{9,16,17,28}



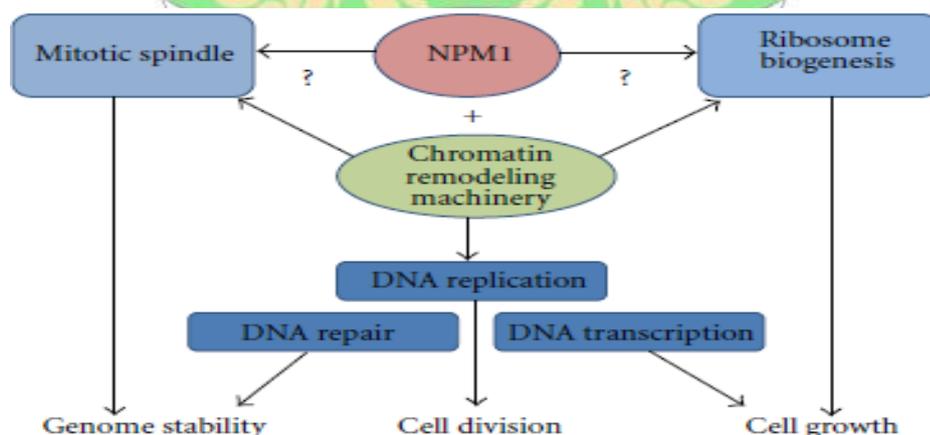
Gambar. 2.3 Struktur *NPM1* dan domain fungsionalnya.¹⁶

Nucleophosmin-1 mengandung satu segmen hidrofobik pada N-terminus yang terlibat dalam oligomerisasi dan aktivitas *chaperone*, diikuti oleh dua bagian asam yang penting untuk berikatan dengan histon. Daerah sentral di antara dua domain asam dibutuhkan untuk aktivitas ribonuklease, bersama dengan domain C-terminal, mengandung daerah utama yang terlibat dalam pengikatan asam nukleat. Bagian aromatik, mengandung dua residu triptofan (288 dan 290) yang dibutuhkan untuk lokalisasi nukleolar protein. *Nucleophosmin-1* juga mengandung *nuclear-localization signal* (NLS) dan *nuclear-export signal* (NES).^{16,17,30}

Nucleophosmin-1 termasuk ke dalam anggota dari keluarga protein *nucleophosmin*, yang merupakan protein *chaperone* nuklear yang berfungsi sebagai penyusunan histon dan faktor kondensasi kromatin. Pada N-terminus, memiliki homologi 50% dengan protein *NPM*. Fungsi utama *NPM1* adalah berikatan dengan bagian tengah histon dan mentransfer DNA ke bagian tersebut dalam reaksi yang membutuhkan *ATP*. *Nucleophosmin-1* memiliki fungsi dan domain tambahan, seperti aktivitas enzimatis ribonuklease dan domain yang berikatan dengan asam nukleat pada bagian C-terminal. Gen *NPM1* juga berfungsi sebagai tumor supresi dan meningkat ekspresinya pada berbagai keganasan seperti leukemia, limfoma, tumor ginjal, hepar, payudara, vesika urinaria, tiroid dan ovarium^{9,16,17,30}

2.2.2. Fungsi *NPM1*

Nucleophosmin-1 merupakan protein multifungsi yang berikatan dengan histon. *Nucleophosmin-1* dapat mempengaruhi replikasi DNA, perbaikan dan transkripsi dengan cara berinteraksi dengan komponen kromatin seperti histon dan protein remodeling kromatin.^{18,32}

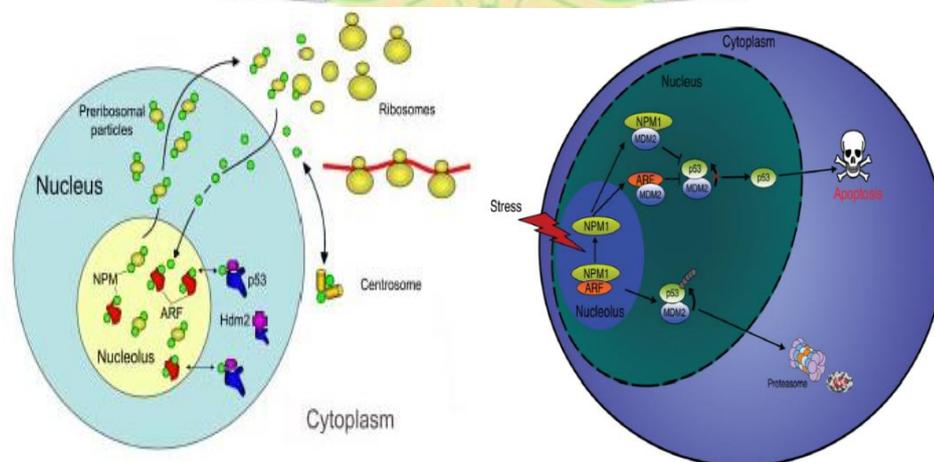


Gambar. 2.4. Fungsi *NPM1*¹⁶

Nucleophosmin-1 juga dibutuhkan untuk progresi mitosis dan juga dapat mempromosikan biogenesis ribosom. Pengaruh-pengaruh tersebut dapat meningkat melalui kemampuan *NPM1* berikatan dengan histon di sentromer atau di nukleolus (Gambar 2.4.).¹⁶

2.2.3. Biogenesis ribosom & regulasi apoptosis

Nucleophosmin-1 sebagai protein yang dapat berpindah-pindah (*shuttling protein*), memiliki peran penting dalam biogenesis ribosom karena *NPM1* mentranspor partikel preribosomal ke sitoplasma. *Nucleophosmin-1* di dalam sitoplasma akan berikatan dengan sentrosom yang tidak terduplikasi dan meregulasi duplikasi sentrosom tersebut selama pembelahan sel. *Nucleophosmin-1* juga berinteraksi dengan *p53* dan molekul regulatornya (*Arf*, *Hdm2/Mdm2*) sehingga mempengaruhi jalur onkosupresi *Arf-Hdm2/Mdm2-p53* untuk terjadinya peningkatan apoptosis jika adanya stress onkogenik. Peran *Arf* dalam jalur *p53* melalui interaksi dengan *Mdm2* sangatlah penting. Protein *Arf* sebagian besar ditemukan di nukleolus dalam bentuk kompleks bersama *NPM1* dan bukan di nukleoplasma yang merupakan tempat *p53* dan *Mdm2* (Gambar 2.5).^{9,16}



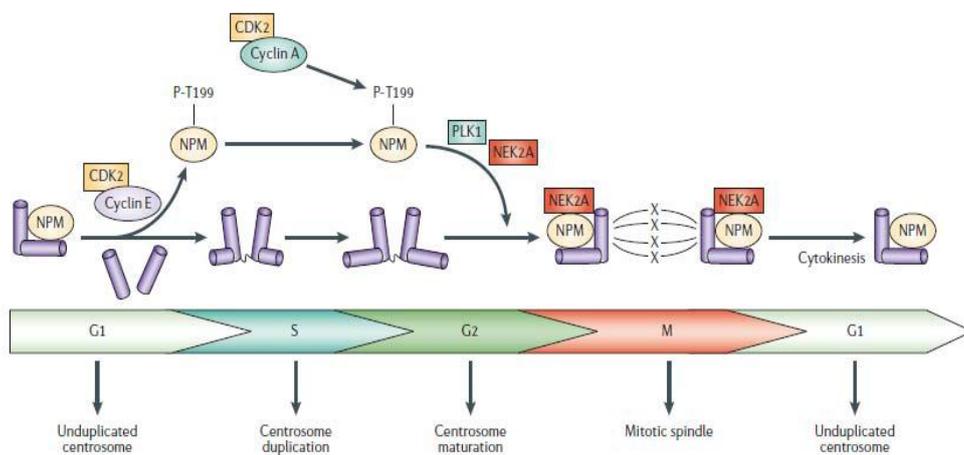
Gambar. 2.5 Peran *NPM1* dalam biogenesis ribosom & regulasi apoptosis.^{9,16}

Interaksi antara Arf dan *NPM1* di nukleolus memfasilitasi kontak antara *Arf* dan mesin-mesin pemroses ribosom. Stabilitas *Arf* secara signifikan meningkat pada sel yang mengekspresikan *NPM1* eksogenus secara berlebihan. *Nucleophosmin-1* memiliki peran penting dalam memodulasi fungsi *Arf* dan dalam respon seluler terhadap stres onkogenik. Sel yang kurang mengekspresikan *NPM1* menunjukkan penurunan kestabilan protein *Arf* dan rentan terhadap transformasi. Mutan *Arf* yang tidak dapat berikatan dengan *NPM1* juga dapat menjadi tidak stabil dan rusak secara fungsi. Pada fibroblas embrio tikus yang kehilangan *NPM1* dan *p53*, telah diketahui bahwa *Arf* tereksklusi dari nukleolus dan menjadi tidak stabil. Protein *Arf* dapat menghambat progresi siklus sel melalui mekanisme *p53-dependent* dan *p53-independent*. Protein *Arf* dapat mencegah proliferasi sel yang tidak memiliki *p53* dan *Mdm2*, walaupun kurang efisien jika dibandingkan jika melalui mekanisme *p53-dependent*. Oleh karena itu, *Arf* dapat mencegah proliferasi sel dengan cara menghambat biogenesis ribosom melalui mekanisme *p53-independent*.^{16,30,31}

2.2.4. Duplikasi sentrosom

Nucleophosmin-1 juga terlibat dalam pengaturan duplikasi sentrosom dan mitosis. Pada fase G1, *NPM1* yang berasosiasi dengan sentrosom akan berdisosiasi dari sentrosom setelah terfosforilasi pada posisi threonin 199 oleh *cyclin-dependent kinase 2* (CDK2)-cyclin E. Fosforilasi tersebut memicu separasi sentriol dan menginisiasi replikasi sentrosom. Selama duplikasi dan maturasi sentrosom (fase S dan G2), *NPM1* sitoplasmik dicegah berasosiasi dengan sentrosom dengan adanya fosforilasi dengan CDK2-cyclin A. Selama mitosis, *NPM1* berasosiasi kembali dengan sentrosom pada spindle mitotik. Asosiasi kembali tersebut tergantung pada aktivitas fosforilasi dari polo-like kinase 1 (PLK1). Fungsi dari mitosis *gene A-*

related kinase 2 (NEK2A) dihubungkan dengan pembentukan spindel yang tepat (Gambar 2.6). Inaktivasi gen *NPM1* menyebabkan duplikasi sentrosom yang tidak terbatas dan ketidakstabilan genomik, hal tersebut memperlihatkan bahwa gen *NPM1* penting untuk perkembangan embrionik dan pemeliharaan kestabilan genomik.^{16,29,30}

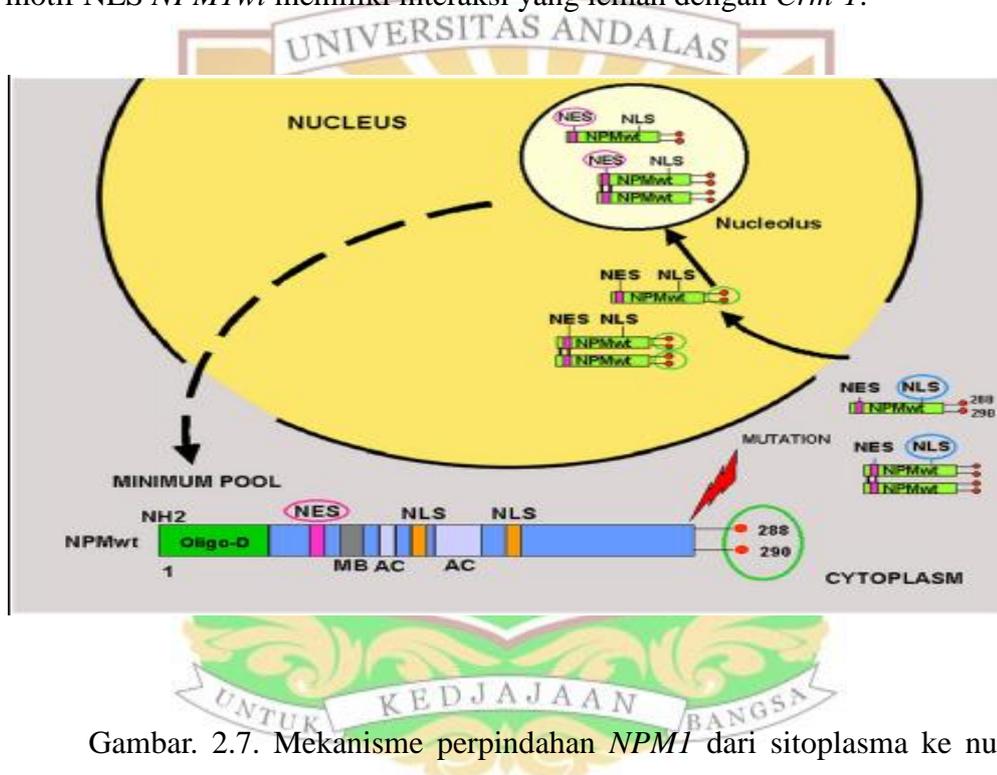


Gambar. 2.6 Model hipotetikal dari keterlibatan *NPM1* dalam pengaturan duplikasi sentrosom dan mitosis.³¹

2.2.5. Lokalisasi Nuklear *NPM1*

Nucleophosmin-1 merupakan phosphoprotein nuklear yang banyak dalam sel, berfungsi sebagai *chaperone* molekuler dan berpindah antara nukleus dan sitoplasma. Penjelasan tersebut berdasarkan analisis dari domain fungsional *NPM1* (Gambar 2.7). Sinyal *NLS* mengatur *NPM1* dari sitoplasma ke nukleoplasma dan bertranslokasi ke nukleolus melalui *nucleolar binding domain* khususnya asam amino triptofan 288 dan 290.³²

Ekspor nuklear *NPM1* (dan protein pada umumnya) dimediasi oleh *Crm-1* (exportin 1), yaitu reseptor ekspor dari protein yang mengandung motif NES yang kaya akan Leusin. Dua motif NES yang sangat lestari pada protein *NPM1_{wt}* telah diidentifikasi di dalam residu 94-102 dan N-terminus di dalam asam amino 42 sampai 61 dengan leusin 42 dan 44 sebagai residu ekspor nuklear yang penting. Akan tetapi, walaupun memiliki motif NES, *NPM1* tetap akan terlokalisasi di nukleoli atau impor nuklear dari *NPM1_{wt}* lebih dominan daripada eksportnya karena motif NES *NPM1_{wt}* memiliki interaksi yang lemah dengan *Crm-1*.³²



Gambar. 2.7. Mekanisme perpindahan *NPM1* dari sitoplasma ke nukleolus. Kotak hijau menunjukkan protein *NPM1* dan lingkaran merah adalah residu triptofan, motif *NES* menunjukkan motif sinyal ekspor nuklear, sedangkan *NLS* sinyal lokalisasi nuklear. Impor nuklear dari *NPM1* (tanda panah) sangat mendominasi dari pada ekspor nuklear (panah putus-putus).³¹

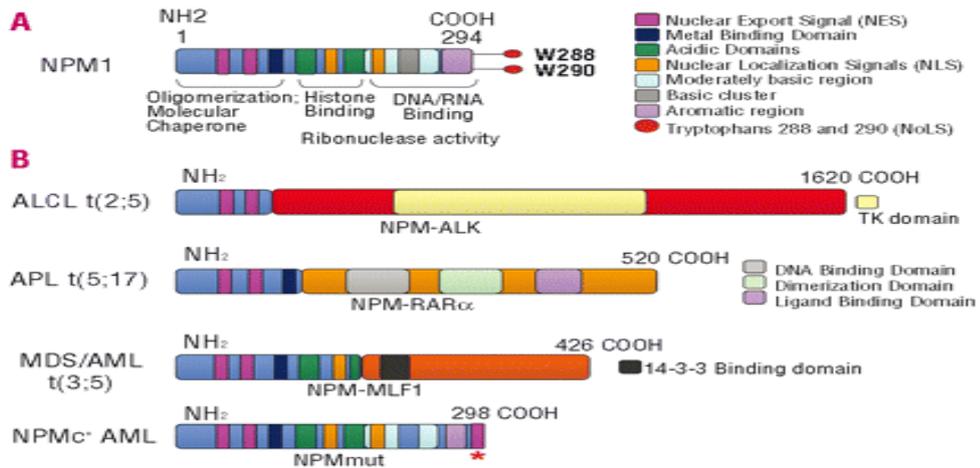
Pada LMA dengan *NPM1* sitoplasmik, lokalisasi *NPM1* sitoplasmik abnormal dapat dengan mudah dideteksi menggunakan imunohistokimia. Lokalisasi abnormal ini disebabkan oleh dua mutasi yang berhubungan dengan perubahan pada C-

terminus dari mutan *NPM* leukemik. Pertama yaitu pembentukan dari penambahan motif NES yang kaya akan leusin dan kedua yaitu hilangnya residu triptofan 288 dan 290 (atau residu 290 saja) yang menentukan lokalisasi nukleolar *NPM1*. Kedua perubahan tersebut sangat mengganggu perpindahan mutan *NPM1*.^{32,33}

2.2.6. Peran mutasi gen *NPM1* pada LMA

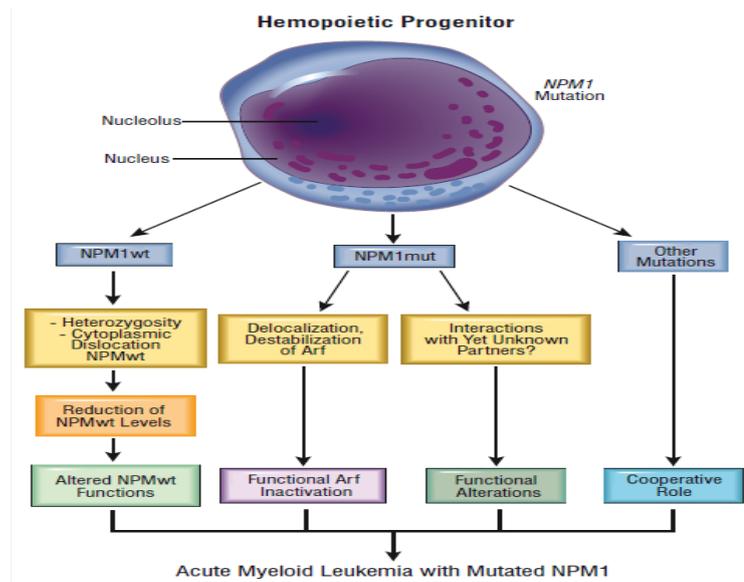
Gen *NPM1* merupakan target kelainan genetik yang paling sering pada keganasan hematopoetik. Mutasi gen *NPM1* berupa translokasi kromosom pada LMA. Tiga tipe utama mutasi *NPM1* telah dideskripsikan, yaitu insersi empat nukleotida pada posisi 959, delesi empat sampai lima nukleotida ditambah insersi sembilan nukleotida dan delesi sembilan nukleotida ditambah insersi empat belas nukleotida. Semua tipe mutasi tersebut secara konsisten menghasilkan kelainan dalam kerangka baca pada daerah C-terminal protein dengan hilangnya satu sampai dua triptofan yang penting untuk lokalisasi nukleolus.³¹

Translokasi kromosom hanya terjadi pada bagian N-terminal dari *NPM1*, dimana *NPM1* berfusi dengan pasangan gen yang berbeda. Selain itu, daerah kromosom nomor 5 lokus 23, tempat *NPM1* dipetakan, kadang kala terdelesi atau hilang pada pasien dengan *myelodysplastic syndrome* (MDS). Pada keganasan darah, *NPM1* muncul dan berkontribusi terhadap onkogenesis dengan mengaktifkan potensi onkogenik dari pasangan protein yang difusikan, seperti ALK, RAR α , atau MLF (Gambar 2.8).³¹



Gambar. 2.8. A. Struktur dan domain fungsional *NPM1*. B. Struktur dan fungsional *NPM1* berubah pada keganasan hematologi.

Mekanisme molekular yang menjadi dasar perkembangan LMA dengan mutasi gen *NPM1* masih belum jelas. Hipotesis yang beralasan adalah LMA dengan mutasi gen *NPM1* berasal dari beberapa kejadian, antara lain haploinsufisiensi *NPMwt*, aktivitas onkogenik intrinsik dari mutan *NPM1*, dan kemungkinan kerja sama dengan kelainan genetik lainnya (Gambar. 2.9). Kelainan genetik yang mungkin bekerja sama dengan mutasi gen *NPM1* antara lain aberasi kromosom, dan mutasi pada gen yang berperan pada hematopoiesis seperti *FLT3*. Jika terjadi insufisiensi *NPM1* maka akan terjadi duplikasi sentrosom yang tidak terbatas, ketidakstabilan genomik, dan perkembangan keganasan mieloid. Pada LMA dengan mutasi *NPM1*, sel leukemik merupakan haploinsufisiensi untuk *NPMwt* karena mutasi gen *NPM1* berupa monoalelik. Selain itu, kadar *NPM1wt* di lokasi fisiologis (nukleolus) kemudian dikurangi oleh rekrutmen dalam sitoplasma melalui pembentukan heterodimer dengan mutan. Dengan demikian, hipotesis yang menarik adalah terdapatnya insufisiensi *NPM1* berperan dalam patogenesis LMA dengan mutasi gen *NPM1*.^{32,33}



Gambar. 2.9. Mekanisme yang mendasari hipotesis patogenesis LMA dengan mutasi gen *NPM1*.³³

Leukemia Mieloid Akut dengan mutasi gen *NPM1* memiliki kariotipe normal karena mutan *NPM1* dapat berikatan dengan sentrosom dan memastikan kontrol dalam pembelahan sel. Kehilangan fungsi *NPM1* selain yang terkait untuk mengendalikan duplikasi sentrosom juga terlibat dalam leukemogenesis.^{16,17,31}

Peran penting lain dari mutasi *NPM1* dalam perkembangan LMA dapat disebabkan oleh mutan *NPM1* itu sendiri. Walaupun belum jelas bagaimana hal tersebut terjadi, sejumlah besar bukti menunjukkan adanya ekspresi sitoplasmik yang menyimpang sebagai kejadian penting dalam proses leukemogenesis. Mutan leukemik gen *NPM1* diketahui akan mengikatkan *Arf* dan dislokasi *NPMwt* ke sitoplasma sehingga aktivitasnya terganggu. Namun, diketahui bahwa gangguan perpindahan mutan tersebut dapat mempengaruhi protein lain, sehingga berkontribusi terhadap LMA. Pada akhirnya, seperti pada subtipe LMA yang lain,

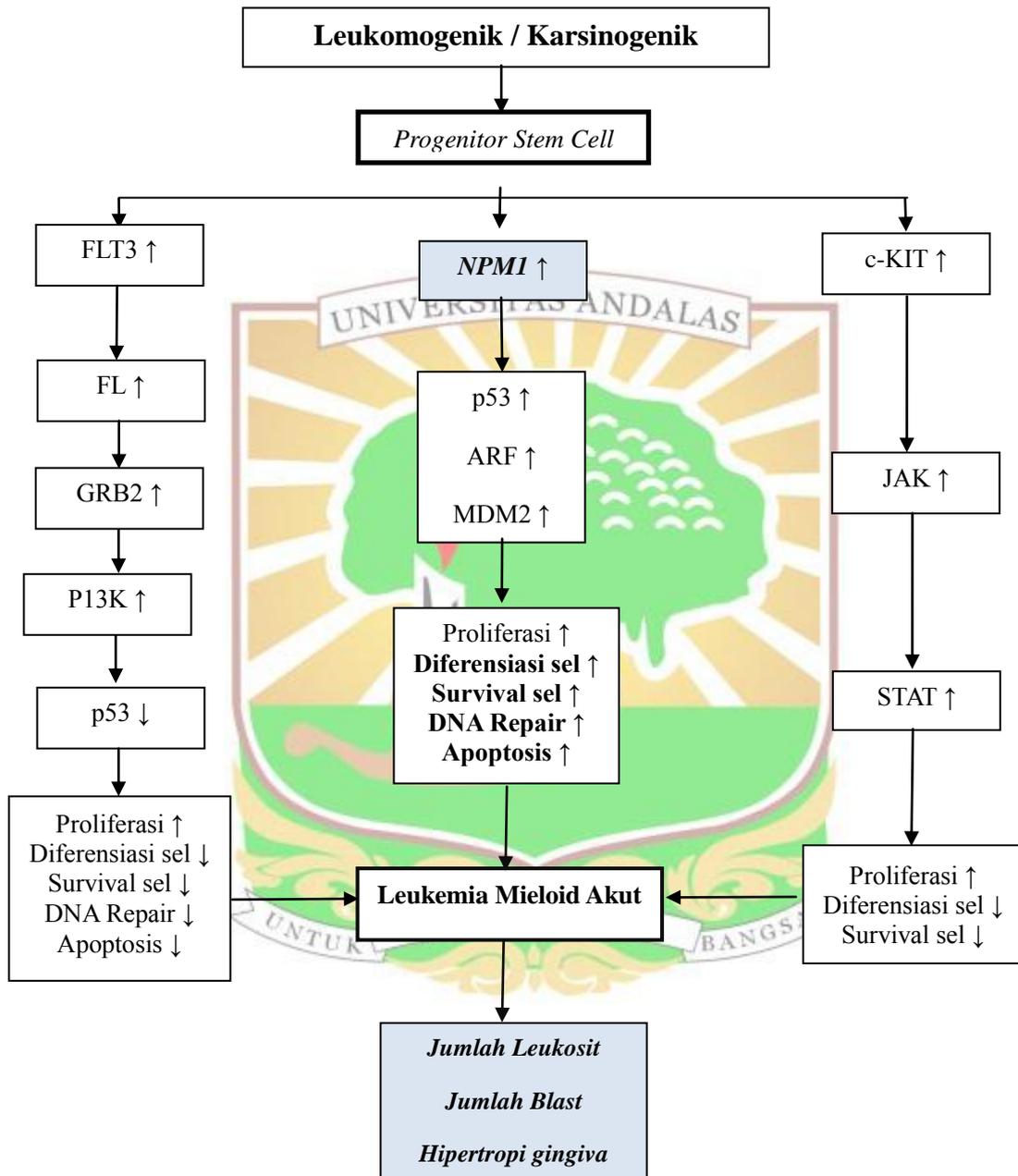
perubahan genetik tambahan dapat bekerja sama dengan mutasi *NPM1* untuk mempromosikan leukemia.^{16,17,31}

Leukemia Mieloid Akut dengan mutasi *NPM1* sangat responsif terhadap kemoterapi induksi. Sekitar 80% pasien mencapai remisi komplit setelah 16 hari dimulainya kemoterapi. Kemosensitif dari LMA dengan mutasi *NPM1* mungkin berhubungan dengan dislokasi *NPM1* dari nucleolus ke sitoplasma, namun penyebab pasti mekanisme yang menyebabkan terjadinya mutasi masih belum diketahui. Transplantasi sumsum tulang tidak perlu dilakukan pada LMA yang memiliki remisi komplit setelah kemoterapi dan hanya diobati dengan terapi konvensional.^{32,33}



BAB 3
KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1. Kerangka Konseptual



Gambar. 3.1. Kerangka Konseptual

Keterangan:

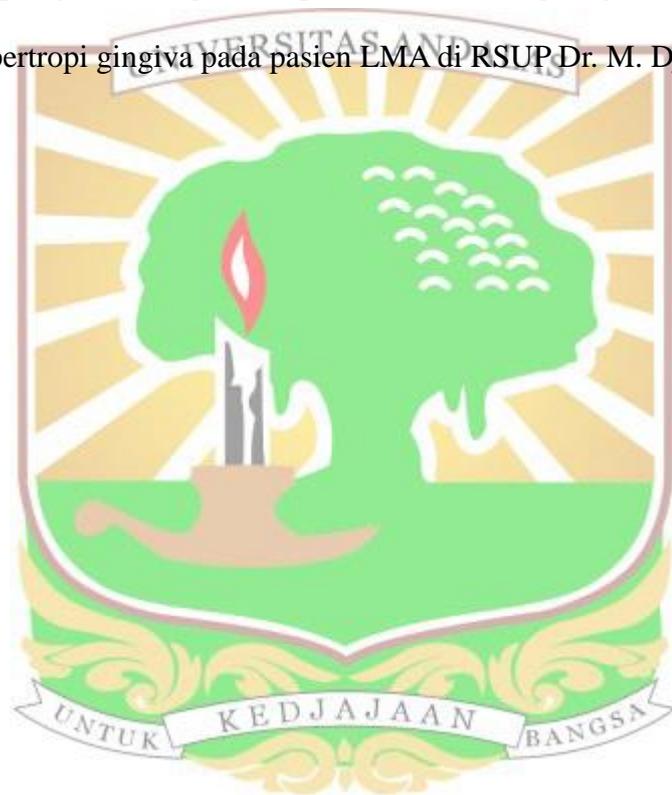
Gen *NPM1* memiliki peran penting pada pasien LMA melalui peningkatan proliferasi sel, diferensiasi sel, survival sel tetapi juga dalam proses stabilitas gen melalui repair DNA dan apoptosis sel progenitor sistem hematopoietik. Jika terjadi mutasi pada *NPM1* maka akan terjadi overekspresi *NPM1*. Gen *NPM1* akan berinteraksi dengan *alternating reading frame (ARF)* di dalam nukleolus. Gen *NPM1* berbentuk dimer dalam nukleolus akan berikatan dengan *MDM2* agar menghambat terjadinya degradasi *p53*. Gen *NPM1* juga akan mengaktivasi *p53* yang akan merangsang terjadinya transkripsi dari gen *NPM1* dalam siklus sel dengan peningkatan proliferasi sel, diferensiasi sel, survival sel, repair DNA dan proses apoptosis. Sehingga overekspresi *NPM1* akan memberikan prognosis baik pada pasien LMA. Disamping itu overekspresi *NPM1* sangat erat hubungannya dengan jumlah leukosit, jumlah *blast* dan hipertropi gingiva.

Selain mutasi *NPM1*, juga sering terjadi mutasi gen *FLT3* dan *cKIT*. Jika terjadi overekspresi *FLT3*, maka akan mengakibatkan peningkatan interaksi antara reseptor *FLT3* dengan ligan (FL). Sehingga terjadi perubahan konformasi yang menyebabkan terungkapnya reseptor dan pemaparan dari domain dimerisasi. Dimerisasi reseptor ini adalah awal dari aktivasi enzim tirosin kinase, yang menyebabkan fosforilasi berbagai situs di domain intraseluler. Ligan (FL) juga akan mengaktifkan *GRB2* yang kemudian mengaktivasi jaringan *phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K)* yang akan menghambat *p53*. Penurunan *p53* maka akan terjadi peningkatan proliferasi sel, penurunan diferensiasi sel, survival sel, repair DNA dan apoptosis yang berdampak terhadap gangguan blokade maturitas sehingga menyebabkan peningkatan jumlah sel mieloblast dan leukosit. Akhirnya dengan terjadinya overekspresi *FLT3* akan memberikan prognosis buruk pada LMA.

Mutasi lain yang sering terjadi diantaranya mutasi *c-KIT* menginduksi aktivasi jalur sinyal melalui jalur *JAK*. *JAK* yang mengaktifkan *signal transducer and activator transcription factor (STAT)* yang akhirnya menyebabkan peningkatan proliferasi sel, penurunan diferensiasi sel dan survival sel. Mutasi *c-KIT* juga dapat menentukan prognosis sedang pada pasien LMA.

3.2. Hipotesis Penelitian

Terdapatnya hubungan ekspresi *NPML* dengan jumlah leukosit, jumlah *blast* dan hipertropi gingiva pada pasien LMA di RSUP Dr. M. Djamil Padang.



BAB 4

METODOLOGI PENELITIAN

4.1. Desain Penelitian & Subjek Penelitian

Penelitian ini adalah suatu penelitian observasional analitik dengan pendekatan pontong lintang (*cross-sectional*), yaitu variabel dependen dan independen yang diperiksa secara bersamaan. Subjek Penelitian adalah semua pasien LMA dewasa di RSUP Dr. M. Djamil Padang yang memenuhi kriteria penelitian ini.

4.2. Tempat dan Waktu Penelitian

Tempat penelitian di poliklinik khusus Hematologi Onkologi Medik dan Instalasi Rawat Inap Penyakit Dalam RSUP Dr. M. Djamil Padang. Pelaksanaannya selama 6 bulan. Jadwal penelitian berdasarkan tahapan yang akan dilalui disajikan pada tabel 4.1.

Tabel. 4.1. Jadwal penelitian

Kegiatan	Bulan I	Bulan II	Bulan III	Bulan IV	Bulan V	Bulan VI
Persiapan						
Pengumpulan Data						
Analisis Data						
Penulisan Hasil						

4.3. Populasi dan Sampel

Populasi penelitian ini adalah pasien LMA yang kontrol ke poliklinik khusus Hematologi Onkologi Medik dan pasien yang dirawat di Instalasi Rawat Inap

Penyakit Dalam RSUP Dr. M, Djamil Padang. Sampel adalah pasien yang memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi. Terhadap subjek yang potensial dilakukan *screening* awal, dijelaskan protokol penelitian dan dimintai persetujuan penelitian (*informed consent*).

4.4. Kriteria Inklusi dan Eksklusi

Kriteria Inklusi

1. Penderita leukemia mieloid akut (LMA) dengan pemeriksaan sumsum tulang yang memenuhi kriteria *French American British (FAB)*
2. Belum menjalani kemoterapi
3. Bersedia ikut penelitian

Kriteria Eksklusi

1. Tumor ganas (prostat, ovarium, ginjal, hepar, usus, tiroid, payudara, limfoma, tumor gingiva), Gum Disease (DM) dan infeksi akut.

4.5. Estimasi Besar Sampel

$$n = \left\{ \frac{(Z\alpha + Z\beta)}{\left\{ 0,5 \ln \left[\frac{(1+r)}{(1-r)} \right] \right\}} \right\}^2 + 3$$

Keterangan :

n : Besar sampel penelitian

Z α : Tingkat kemaknaan ($\alpha=0,05$, Z $\alpha=1,960$)

Z β : Power penelitian ($\beta=0,2$, Z $\beta=0,842$)

r : Perkiraan koefisien relative (0,6)

ln : Nilai yang didapatkan dari tabel ln yang besarnya tergantung nilai r

Dengan menggunakan rumus diatas didapatkan jumlah sampel sebesar 25 orang. Subjek yang memenuhi kriteria inklusi dan tidak terdapat kriteria eksklusi diambil sebagai sampel.

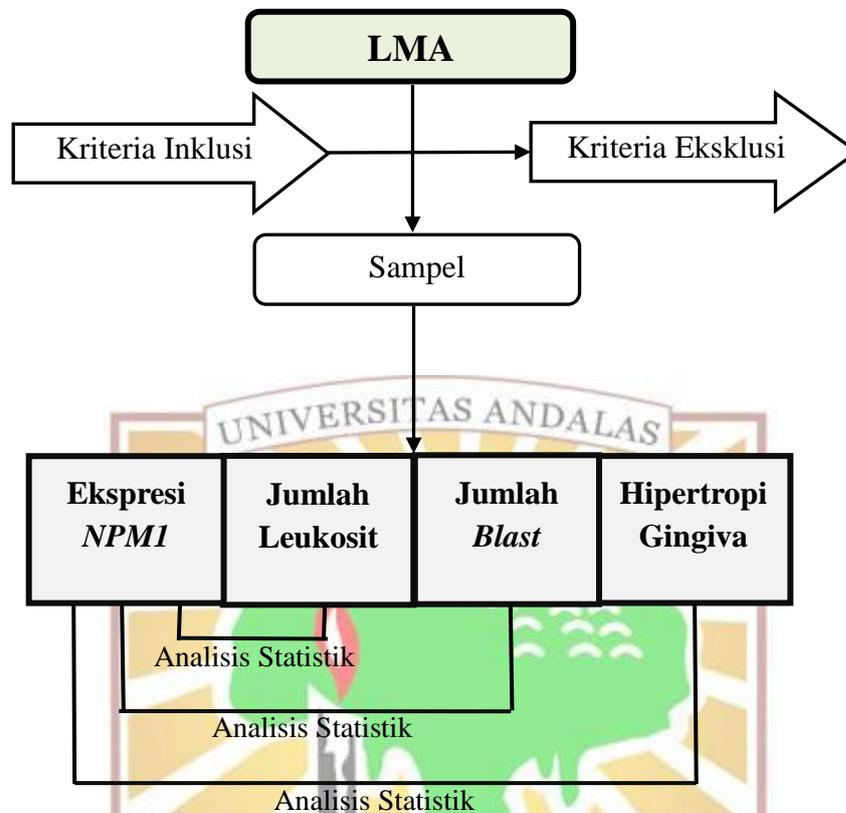
4.6. Definisi Operasional

1. *Leukemia Mieloid Akut* : LMA yang ditandai oleh ekspansi klonal sel *mieloblast* di sumsum tulang, darah atau jaringan, ditandai oleh $\geq 20\%$ *mieloblast* di sumsum tulang.⁷
2. Hitung leukosit : Jumlah leukosit yang terdapat dalam darah tepi ($/\text{mm}^3$) menggunakan alat Sysmex XT 2000i.⁷
3. Jumlah *blast* : Jumlah *mieloblast* dalam sumsum tulang (%).⁷
4. Hipertropi gingiva : Pembesaran jaringan gingiva secara berlebihan di antara gigi dan atau pada daerah leher gigi. Dikelompokkan atas hipertropi gingiva positif atau negatif yang diperiksa secara klinis.^{18,19}
5. Ekspresi *NPM1* : Jumlah mutasi *NPM1* di dalam plasma. Sampel diambil dari plasma kemudian diperiksa dengan metode *qRT-PCR*(*copies/ml*).^{13,21}

4.7. Prosedur Penelitian

1. Semua pasien yang memenuhi syarat, diikutkan dalam penelitian dan dimintakan persetujuan secara sukarela.
2. Pasien yang memenuhi kriteria inklusi dan tidak terdapat kriteria eksklusi dicatat umur dan jenis kelamin.
3. Kemudian dicatat pemeriksaan jumlah leukosit, jumlah *blast*, serta hipertropi gingiva positif atau negatif berdasarkan klinis.
4. Selanjutnya dilakukan pemeriksaan ekspresi *NPM1* dari darah plasma dengan menggunakan metode *qRT-PCR*.
5. Dilakukan analisis statistik berdasarkan variabel-variabel yang dinilai.

4.8. Kerangka Penelitian



Gambar. 4.1. Kerangka Penelitian

Keterangan :

Pasien LMA di Poliklinik Hematologi Onkologi Medik dan rawat inap Bagian Penyakit Dalam RSUP Dr. M. Djamil Padang yang memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi sebanyak perhitungan jumlah sampel minimal yaitu 25 orang, dicatat umur, jenis kelamin, jumlah leukosit, jumlah *blast* dan kejadian hipertropi gingiva. Kemudian dilakukan pemeriksaan ekspresi *NPM1* dengan *qRT-PCR*. Selanjutnya dilakukan analisis statistik ekspresi *NPM1* dan hubungannya dengan jumlah leukosit, jumlah *blast* dan hipertropi gingiva pada pasien LMA.

4.9. Analisis Data

Dilakukan analisis data dasar dari karakteristik pasien. Data yg bersifat kategorik ditampilkan dalam bentuk frekuensi & persentase, data yg bersifat numerik dalam bentuk rerata & standar deviasi. Pada data numerik dilakukan uji normalitas menggunakan uji Kolmogorov Smirnov. Dilakukan analisis korelasi antara ekspresi *NPM1* dengan jumlah leukosit dan jumlah *blast* dinyatakan dalam koefisien korelasi. Digunakan uji korelasi Pearson bila data terdistribusi normal, atau uji korelasi Spearman bila data tidak terdistribusi normal. Korelasi mutlak akan memberikan nilai $r = 1$, sangat kuat (0,8–1,0), kuat (0,6–0,799), sedang (0,4–0,599), lemah (0,0–0,399). Arah korelasi positif menunjukkan semakin besar nilai satu variabel semakin besar pula nilai variabel lainnya. Korelasi negatif menunjukkan semakin besar nilai satu variabel, semakin kecil nilai variabel lainnya. Data diolah dengan SPSS 21.0, dihitung nilai kemaknaannya, bermakna jika $p < 0,05$. Dilakukan analisis hubungan antara ekspresi *NPM1* dengan hipertropi gingiva dengan uji beda (T test).

4.10. Etika Penelitian

Pasien dan keluarga diberikan penjelasan tentang maksud dan tujuan penelitian serta manfaat yang diharapkan dari penelitian ini. Setelah memahami dengan jelas, penderita dan keluarga diminta menandatangani surat persetujuan jika tidak keberatan diikuti sertakan pada penelitian ini. Kemudian dilakukan pengambilan sampel.

BAB 5 HASIL PENELITIAN

Telah dilakukan penelitian terhadap 25 orang pasien LMA di poliklinik rawat jalan dan rawat inap Bagian Penyakit Dalam RSUP Dr. M. Djamil Padang. Pengumpulan sampel dilakukan selama 6 bulan yaitu dari bulan Maret sampai Agustus 2018. Sampel penelitian dipilih secara *consecutive sampling* yang memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi.

5.1. Karakteristik Dasar Penelitian

Pada penelitian ini didapatkan karakteristik dari 25 orang sampel pasien LMA seperti terlihat pada tabel 5.1. Dari tabel 5.1 ini terlihat bahwa 68% pasien LMA pada penelitian ini adalah laki-laki yaitu sebanyak 17 pasien dan 32% perempuan yaitu sebanyak 8 pasien. Kelompok umur terbanyak dari sampel yang diteliti adalah rentang umur <40 tahun yaitu sebanyak 40%, diikuti rentang umur 40-60 tahun yaitu 28%, umur >60 tahun sebanyak 32%. Pada penelitian ini didapatkan nilai rerata umur pada pasien LMA adalah 47,8 tahun.

Dari tabel 5.1 berdasarkan kriteria *French American British* (FAB) dapat dilihat bahwa tipe LMA yang terbanyak yaitu LMA tipe M4 yaitu sebanyak 16 pasien (64%), kemudian berturut-turut diikuti M5, M6, M2, M3 sebanyak 4 pasien (16%), 2 pasien (8%), 2 pasien (8%), M3 1 pasien (4%), dan tidak ditemukan M0, M1 dan M7.

Tabel. 5.1 Karakteristik dasar pasien leukemia mieloid akut (LMA)

Karakteristik	n (25)	% (100)
Jenis kelamin		
▪ Laki-laki	17	68
▪ Perempuan	8	32
Umur (tahun)		
▪ < 40	10	40
▪ 40 - 60	7	28
▪ > 60	8	32
Tipe LMA (FAB)		
▪ M0	-	-
▪ M1	-	-
▪ M2	2	8
▪ M3	1	4
▪ M4	16	64
▪ M5	4	16
▪ M6	2	8
▪ M7	-	-

5.2. Ekspresi *NPM1*, jumlah leukosit dan jumlah *blast* pada LMA

Pada tabel 5.2 terlihat rerata ekspresi *NPM1* pada LMA adalah $22,62 \times 10^7$ *copies/ml* dan standar deviasi sebesar $18,54 \times 10^7$ *copies/ml*. Jumlah ekspresi *NPM1* ini lebih tinggi bila dibandingkan dengan nilai normal yaitu 1×10^7 *copies/ml*. Dilakukan uji distribusi data menggunakan uji kolmogorov smirnov didapatkan hasil $p > 0,05$ menunjukkan bahwa data terdistribusi normal.

Tabel. 5.2 Rerata ekspresi *NPM1*, jumlah leukosit dan jumlah *blast* pada pasien leukemia mieloid akut.

Variabel	Mean (SD)
<i>NPM1</i> (10^7 copies/ml)	22,62 (18,54)
Leukosit (mm^3)	40.560 (29.580)
<i>Blast</i> (%)	45,48 (15,01)

Dari tabel 5.2 diatas juga terlihat nilai rerata *blast* sebesar 45,48% dengan standar deviasi 15,01%. Jumlah rerata *blast* ini lebih tinggi bila dibandingkan dengan jumlah *blast* normal pada sum-sum tulang yaitu 0-1% dan dengan *one sample t test* pada penelitian ini didapatkan perbedaan yang bermakna $p < 0,05$. Dilakukan uji distribusi data menggunakan uji kolmogorov smirnov didapatkan hasil $p > 0,05$ menunjukkan bahwa data terdistribusi normal.

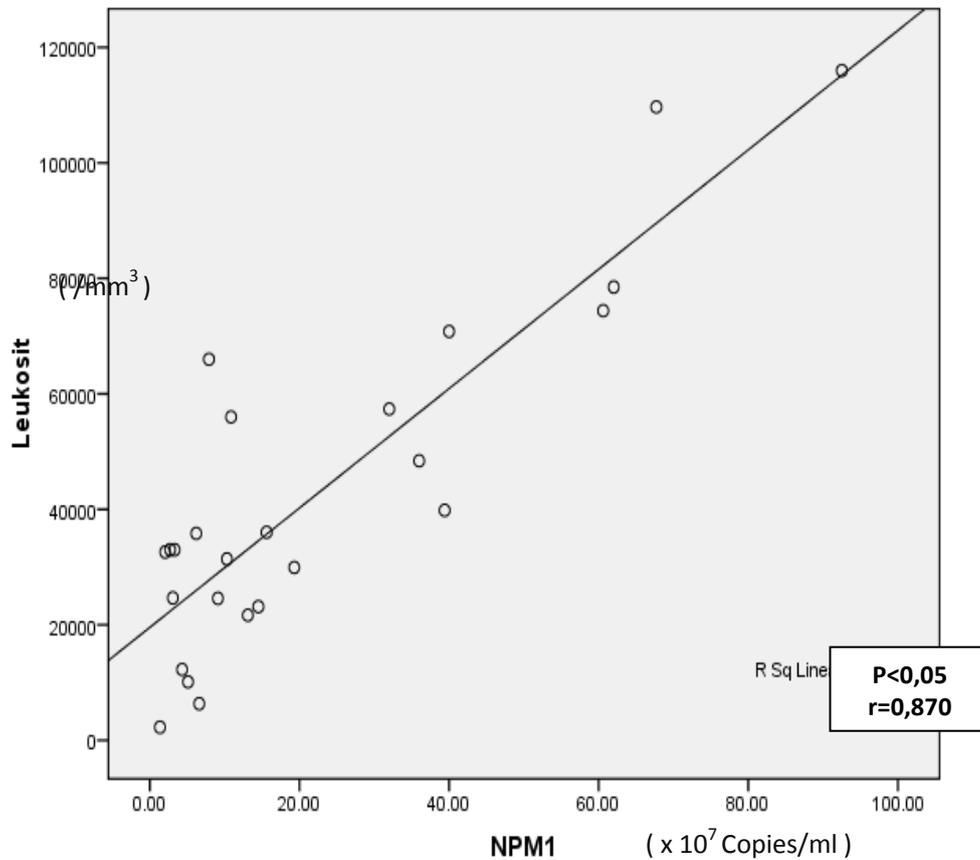
5.3. Gambaran distribusi LMA berdasarkan adanya hipertropi gingiva

Dari tabel. 5.3 berdasarkan adanya hipertropi gingiva pada 25 pasien LMA, didapatkan 15 pasien (60%) yang mengalami hipertropi gingiva positif dan 10 pasien (40%) hipertropi gingiva negatif.

Tabel. 5.3 Gambaran distribusi LMA berdasarkan adanya hipertropi gingiva

Variabel	n (25)	% (100)
Hipertropi Gingiva		
▪ Positif	15	60
▪ Negatif	10	40

5.4. Korelasi ekspresi *NPM1* dengan jumlah leukosit pada pasien LMA

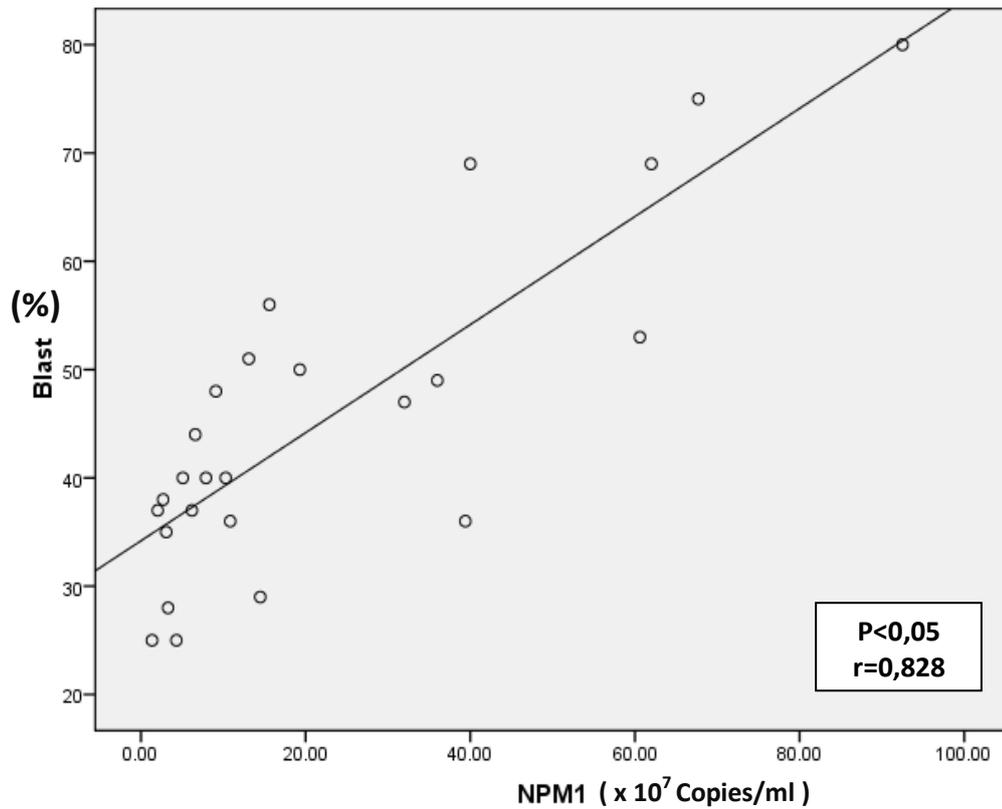


Gambar. 5.1 Korelasi ekspresi *NPM1* dengan jumlah leukosit pada pasien LMA

Pada penelitian ini dilakukan pemeriksaan ekspresi *NPM1* dan jumlah leukosit. Dilakukan uji distribusi data menggunakan uji Kolmogorov-Smirnov didapatkan hasil $p > 0.05$ menunjukkan bahwa data terdistribusi normal dan selanjutnya dilakukan uji Person.

Gambar 5.1 menunjukkan korelasi positif yang bermakna dengan gradasi sangat kuat antara ekspresi *NPM1* dengan jumlah leukosit, terlihat bahwa semakin tinggi ekspresi *NPM1* semakin tinggi jumlah leukosit dengan $p < 0,05$ dan $r = 0,870$.

5.5. Korelasi ekspresi *NPM1* dengan jumlah *blast* pada pasien LMA

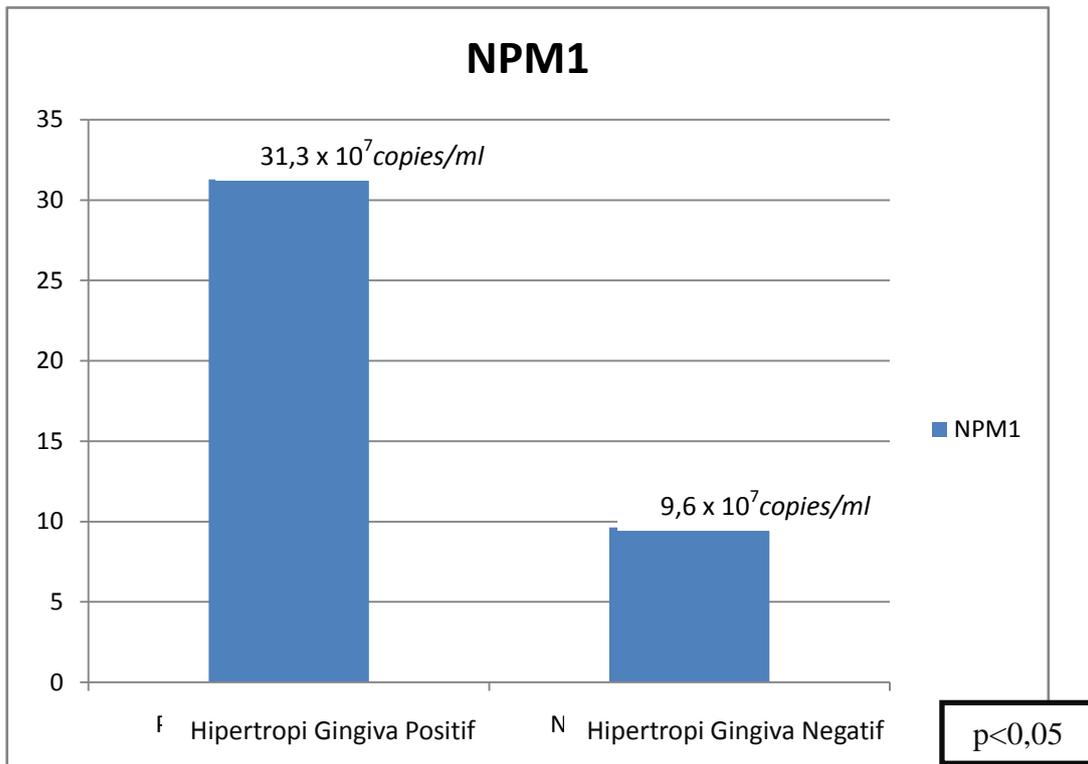


Gambar.5.2 Korelasi ekspresi *NPM1* dengan jumlah *blast* pada pasien LMA

Pada penelitian ini dilakukan pemeriksaan ekspresi *NPM1* dan jumlah *blast*. Dilakukan uji distribusi data menggunakan uji kolmogorov smirnofff didapatkan hasil $p > 0,05$ menunjukkan bahwa data terdistribusi normal dan selanjutnya dilakukan uji Person.

Pada gambar. 5.1 menunjukkan korelasi positif yang bermakna dengan gradasi sangat kuat antara ekspresi *NPM1* dengan jumlah *blast*, terlihat bahwa semakin tinggi ekspresi *NPM1* semakin tinggi jumlah *blast* dengan $p < 0,05$ dan $r = 0,828$.

5.6. Distribusi rerata ekspresi *NPM1* dengan hipertropi gingiva pada LMA



Gambar. 5.3 Distribusi rerata ekspresi *NPM1* dengan hipertropi gingiva pada pasien LMA

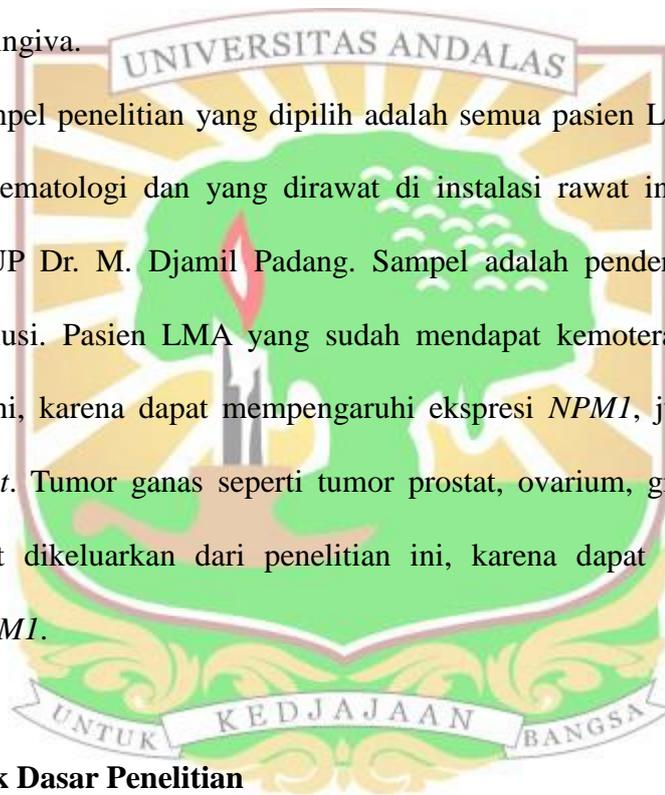
Pada gambar 5.3 dapat dilihat sebaran rerata ekspresi *NPM1* berdasarkan hipertropi gingiva positif dan negatif secara berturut-turut yaitu sebesar $31,3 \times 10^7$ copies/ml dan $9,6 \times 10^7$ copies/ml. Uji statistik untuk menilai ekspresi *NPM1* terhadap hipertropi gingiva pada LMA menggunakan uji T dan didapatkan perbedaan yang bermakna $p<0,05$.

BAB 6

PEMBAHASAN

Penelitian dilakukan terhadap 25 orang pasien leukemia mieloid akut di poliklinik hematologi dan rawat inap Bagian Penyakit Dalam RSUP Dr. M. Djamil Padang. Pengumpulan sampel dilakukan selama 6 bulan, dari bulan Maret 2018 sampai Agustus 2018 untuk mengetahui peningkatan ekspresi *NPM1* pada pasien LMA serta bagaimana hubungannya dengan jumlah leukosit, jumlah *blast* serta hipertropi gingiva.

Sampel penelitian yang dipilih adalah semua pasien LMA yang kontrol ke poliklinik hematologi dan yang dirawat di instalasi rawat inap Bagian Penyakit Dalam RSUP Dr. M. Djamil Padang. Sampel adalah penderita yang memenuhi kriteria inklusi. Pasien LMA yang sudah mendapat kemoterapi dikeluarkan dari penelitian ini, karena dapat mempengaruhi ekspresi *NPM1*, jumlah leukosit serta jumlah *blast*. Tumor ganas seperti tumor prostat, ovarium, ginjal, payudara serta infeksi akut dikeluarkan dari penelitian ini, karena dapat mempengaruhi nilai ekspresi *NPM1*.



6.1. Karakteristik Dasar Penelitian

Dari 25 sampel pasien LMA didapatkan sebagian besar adalah berjenis kelamin laki-laki yaitu sebanyak 17 pasien (68%) dan wanita 8 pasien (32%) dengan rerata umur adalah 47,8 tahun. Kelompok umur terbanyak dari sampel yang diteliti adalah rentang umur <40 tahun yaitu 40%, diikuti umur >60 tahun 32% dan umur 40-60 tahun 28%.

Penelitian Akl *et al* (2012) di Yunani terhadap 20 pasien LMA didapatkan jenis kelamin terbanyak pada laki-laki yaitu 12 pasien (60%), dan wanita 8 pasien

(40%).³⁴ Penelitian lain oleh Meng *et al* (2014) di Malaysia LMA terdapat laki-laki 51% dan wanita 49% dengan umur 40 - 81 tahun.³⁵ Penelitian Ohnishi *et al* (2014) di Jepang pada pasien LMA terhadap 213 orang, didapatkan laki-laki 60% dan wanita 40% dengan rerata umur 70 tahun.³⁶ Hasil penelitian lain di Palestina oleh Abuhelwa *et al* (2017) terhadap 64 pasien LMA dengan usia terbanyak adalah laki-laki dibanding wanita dengan rasio 90% : 10% dan rerata umur 36 tahun.³⁷ Penelitian lain oleh Sittelbanat *et al* (2017) di Sudan terdapat 140 pasien LMA didapatkan laki-laki 50% dan wanita 50% dengan rerata umur 33 tahun.³⁸ Penelitian Khera *et al* (2017) di India terhadap 191 pasien LMA didapatkan laki-laki 57% dan wanita 43% dengan rerata umur 36.9 tahun.³⁹ Penelitian lain oleh Alrajeh *et al* (2017) di Arab Saudi terhadap 100 pasien LMA didapatkan laki-laki 58% dan wanita 42%.⁴⁰ Penelitian lain oleh Jongen *et al* (2018) di Inggris, pasien LMA sebanyak 430 orang didapatkan laki-laki 50% dan wanita 50% dengan rerata umur 51 tahun.⁴¹

Perbedaan jenis kelamin dan rerata umur yang kita dapatkan pada penelitian ini mungkin disebabkan karena jumlah sampel yang berbeda dengan penelitian sebelumnya dengan jumlah sampel yang besar. Perbedaan ini juga dapat terjadi karena kita mengambil sampel secara konsekutif yang memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi sebanyak perhitungan sampel yaitu 25 sampel.

Berdasarkan kriteria *French American British (FAB)*, pada penelitian ini didapatkan jenis LMA terbanyak yaitu LMA yang terbanyak yaitu M4 yaitu sebanyak 16 pasien (64%), kemudian berturut-turut diikuti M5, M6, M2, M3 sebanyak 4 pasien (16%), 2 pasien (8%), 2 pasien (8%), M3 1 pasien (4%), dan tidak ditemukan M0, M1 dan M7. Penelitian Akl *et al* (2012) di Yunani terhadap 20 pasien LMA didapatkan M4 sebanyak 6 orang (30%), dan berturut-turut M5, M2,

M1 yaitu 4 orang (20%), 6 orang (30%) dan 4 orang (20%).³⁴Zidan *et al* (2013) di Mesir, penelitian terhadap 50 pasien LMA didapatkan terbanyak pada LMA tipe M5 sebanyak 12 pasien (27.9%), berturut-turut M4, M2, M1, M3, M6, M0 yaitu 11 orang (25.6%), 7 orang (16.3%), 4 orang (9.3%), 3 orang (7%), 3 orang (7%) dan 2 orang (4.7%).⁴²Hasil penelitian oleh Abuhelwa *et al* (2017) di Palestina pada pasien LMA didapatkan terbanyak tipe M4 sebesar 32.8% diikuti M5 sebesar 21.9% dan selebihnya bukan M4 & M5 sebesar 45,3%.³⁷ Hasil penelitian lain berbeda dengan hasil penelitian sebelumnya oleh Sitelbanat *et al* (2017) di Sudan terhadap pasien tipe LMA terbanyak yaitu M3 sebesar 26.9%, diikuti M4 18.3%, M0 16.1%, M2 15% dan M5 6.5%.³⁸ Perbedaan distribusi tipe LMA ini dapat terjadi karena kita mengambil sampel secara acak dan konsekutif yang memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi sebanyak perhitungan sampel yaitu 25 sampel.

Hasil penelitian Abuhelwa *et al* (2017) di Palestina pada pasien LMA didapatkan rerata kadar leukosit $40.000/\text{mm}^3$.³⁷ Hasil penelitian Sitelbanat *et al* (2017) di Sudan pada pasien LMA didapatkan rerata kadar leukosit sebesar $63.390/\text{mm}^3$ dengan nilai minimum $6.000/\text{mm}^3$ dan maksimum $497.400/\text{mm}^3$.³⁸ Khera *et al* (2017), penelitian di India pada pasien LMA didapatkan rerata kadar leukosit sebesar $39.200/\text{mm}^3$.³⁹ Penelitian oleh Jongen *et al* (2018) di Inggris, 430 pasien pasien LMA ditemukan terbanyak leukosit $\leq 100.000/\text{mm}^3$ sebanyak 387 pasien (90%) dan leukosit $>100.000/\text{mm}^3$ sebanyak 43 pasien.⁴¹ Penelitian oleh Yoshida *et al* (2016) di Jepang, pasien LMA ditemukan rerata leukosit $78.000/\text{mm}^3$ dengan nilai minimum $39.000/\text{mm}^3$ dan nilai maksimum $98.000/\text{mm}^3$.⁴³

Pada penelitian ini didapatkan dari 25 sampel pasien LMA yang terdapat hipertropi gingiva positif sebanyak 15 pasien (60%) dan negatif 10 pasien (40%). Penelitian Yoshida *et al* (2016) di Jepang, pasien LMA yang mengalami hipertropi

gingiva positif 85,2% dibanding negatif 14,8%.⁴³ Penelitian lain oleh Chowdhri *et al* (2018), pasien LMA yang mengalami hipertropi gingiva positif 88,9% dan negatif 11,1%.⁴⁴ Penelitian yang lain oleh Misirliogle *et al* (2014) di Turki, didapatkan pasien LMA yang mengalami hipertropi gingiva positif 65% dan negatif 35%.⁴⁵ Penelitian oleh Dev *et al* (2016) ternyata sering ditemukan hipertropi gingiva pada saat pemeriksaan pasien yang dilakukan oleh dokter gigi yang merupakan manifestasi klinis dari LMA.⁴⁶

6.2. Korelasi ekspresi *NPM1* dengan jumlah leukosit pada pasien LMA

Nucleophosmin-1 (*NPM1*) memiliki peran penting pada pasien LMA melalui peningkatan proliferasi sel, diferensiasi sel, survival sel tetapi juga dalam proses stabilitas gen melalui repair DNA dan apoptosis sel progenitor sistim hematopoetik. Jika terjadi mutasi pada *NPM1* maka akan terjadi overekspresi *NPM1*. Gen *NPM1* akan berinteraksi dengan *alternating reading frame* (*ARF*) di dalam nukleolus. Gen *NPM1* berbentuk dimer dalam nukleolus akan berikatan dengan *MDM2* agar menghambat terjadinya degradasi *p53*. Gen *NPM1* juga akan mengaktivasi *p53* yang akan merangsang terjadinya transkripsi dari gen *NPM1* dalam siklus sel dengan peningkatan proliferasi sel, diferensiasi sel, survival sel, repair DNA dan proses apoptosis. Sehingga overekspresi *NPM1* akan memberikan prognosis baik pada pasien LMA. Disamping itu overekspresi *NPM1* sangat erat hubungannya dengan jumlah leukosit dan jumlah *blast*. Sehingga menyebabkan peningkatan proliferasi sel, peningkatan *survival* sel, peningkatan diferensiasi, regulasi apoptosis dan pertumbuhan sel. Semua gangguan tersebut akan mengakibatkan blokade maturitas sehingga menyebabkan sel *mieloblast* meningkat serta jumlah leukosit juga akan meningkat.^{9,16,24}

Penelitian ini terdapat nilai rerata jumlah leukosit sebesar $40.560/\text{mm}^3$ dan standar deviasi sebesar $29.580/\text{mm}^3$ serta nilai minimum $2.270/\text{mm}^3$ dan maksimum $116.000/\text{mm}^3$. Nilai rerata jumlah leukosit ini lebih tinggi bila dibandingkan dengan jumlah leukosit pada orang normal yaitu $5.000/\text{mm}^3$ - $10.000/\text{mm}^3$. Pada penelitian ini dilakukan pemeriksaan ekspresi *NPM1* dan jumlah leukosit. Dilakukan uji distribusi data menggunakan uji Kolmogorov-Smirnov didapatkan hasil $p > 0.05$ menunjukkan bahwa data terdistribusi normal dan selanjutnya dilakukan uji Person. Hasil analisis memperlihatkan terdapatnya korelasi positif dan terdapat korelasi positif yang bermakna dengan gradasi sangat kuat antara ekspresi *NPM1* dengan jumlah leukosit, terlihat bahwa semakin tinggi ekspresi *NPM1* semakin tinggi jumlah leukosit dengan $p < 0,05$ dan $r = 0,870$.

Penelitian Akl *et al* (2012) di Yunani terhadap pasien LMA didapatkan rerata leukosit $35.000/\text{mm}^3$, dengan nilai minimum $7.000/\text{mm}^3$ dan nilai maksimum $104.000/\text{mm}^3$.³⁴ Hasil penelitian serupa oleh Abuhelwa *et al* (2017) di Palestina pada pasien LMA di dapatkan rerata leukosit $40.100/\text{mm}^3$ dengan nilai minimum $12.500/\text{mm}^3$ dan nilai maksimum $60.500/\text{mm}^3$.³⁷ Hasil penelitian lain oleh Sittelbanat *et al* (2017) di Sudan pada pasien LMA didapatkan rerata leukosit sebesar $63.400/\text{mm}^3$ dengan nilai minimum $6.000/\text{mm}^3$ dan nilai maksimum $97.400/\text{mm}^3$.³⁸ Hasil penelitian lain oleh Khera *et al* (2017) di India pada pasien LMA didapatkan kadar leukosit dengan nilai minimum $39.200/\text{mm}^3$ dan nilai maksimum $42.000/\text{mm}^3$.³⁹ Penelitian oleh Jongen *et al* (2018) di Inggris, 430 pasien pasien LMA ditemukan terbanyak leukosit $\leq 100.000/\text{mm}^3$ sebanyak 387 pasien (90%) dan leukosit $> 100.000/\text{mm}^3$ sebanyak 43 pasien.⁴¹ Penelitian oleh Yoshida *et al* (2016) di Jepang, pada pasien LMA didapatkan rerata leukosit sebesar $78.000/\text{mm}^3$ dengan nilai minimum $39.000/\text{mm}^3$ dan nilai maksimum $98.000/\text{mm}^3$.⁴³

Hasil pada penelitian ini hampir sama dengan hasil penelitian sebelumnya yaitu penelitian Falini *et al* (2011) di Jerman, dimana didapatkan korelasi positif antara ekspresi *NPM1* dengan peningkatan jumlah leukosit pada pasien LMA dengan $p < 0.001$.⁵¹ Hasil pada penelitian ini hampir sama dengan hasil penelitian sebelumnya yaitu penelitian Luo *et al* (2010) di Amerika, dimana didapatkan korelasi positif antara ekspresi *NPM1* dengan jumlah leukosit pada pasien LMA dengan korelasi sedang yang bermakna secara signifikan dengan $p < 0.001$.⁴⁷ Penelitian lain oleh Dhahir *et al* (2012) di Iraq, pasien LMA yang mengalami mutasi *NPM1* mengalami peningkatan hitung leukosit yang lebih signifikan dibanding tanpa mengalami mutasi.⁵² Penelitian lain oleh Leibundgut *et al* (2012) di Swiss, pasien LMA yang mengalami mutasi *NPM1* mengalami peningkatan hitung leukosit yang lebih signifikan dibanding tanpa mengalami mutasi.⁵³ Hasil ini sesuai dengan penelitian Liu *et al* (2013) di Cina mendapatkan hubungan antara ekspresi *NPM1* dengan peningkatan jumlah leukosit dengan $p < 0,01$.⁴⁸ Hasil penelitian ini sama dengan penelitian Jo *et al* (2016) di Korea dimana didapatkan korelasi kuat yang bermakna secara signifikan antara ekspresi *NPM1* dengan peningkatan jumlah leukosit dan *blast* dengan masing-masing $p < 0.001$ dan $r = 0.780$.⁵⁰

Pentingnya peranan *NPM1* ini dalam patogenesis LMA yang dalam hal ini berkaitan dengan petanda prognostik atau prognosis yang baik, maka membantu kita dalam mendiagnosis dan menilai prognosis pasien LMA yang selanjutnya akan memberikan pertimbangan bagi klinisi untuk memberikan kemoterapi. Secara umum dapat kita lihat terdapat peningkatan jumlah leukosit pada pasien LMA dengan berbagai variasi nilai, tergantung pada jumlah dan pengambilan sampel penelitian.

6.3. Korelasi ekspresi *NPM1* dengan jumlah *blast* pada pasien LMA

Nucleophosmin-1 diekspresikan pada tingkat tinggi dalam beberapa spektrum keganasan hematologik, hampir 95% pada pasien LMA. Hal ini menunjukkan bahwa peningkatan ekspresi *NPM1* ini berperan dalam kelangsungan hidup dan proliferasi dari sel *blast* leukemia. *NPM1* berperan dalam proses leukomogenesis, jika terjadi mutasi pada *NPM1* maka akan terjadi peningkatan ekspresi dari *NPM1* yang menyebabkan interaksi dengan *p53* dan molekul regulatornya (*Arf*, *Hdm2/Mdm2*) sehingga mempengaruhi jalur onkosupresi *Arf-Hdm2/Mdm2-p53* untuk terjadinya peningkatan apoptosis jika adanya stress onkogenik. Peran *Arf* dalam jalur *p53* melalui interaksi dengan *Mdm2* sangatlah penting enzim *tirosin kinase*, yang menyebabkan fosforilasi berbagai domain intraseluler. Semua gangguan tersebut akan mengakibatkan blokade maturitas sehingga menyebabkan peningkatan jumlah sel *blast*.^{23,24}

Pada penelitian ini terdapat analisis hubungan antara ekspresi *NPM1* dengan jumlah *blast* digunakan uji korelasi Pearson dengan derajat kepercayaan $p < 0,05$. Hasil analisis memperlihatkan adanya korelasi antara ekspresi *NPM1* dengan jumlah *blast* dengan arah korelasi positif yang bermakna dengan gradasi sangat kuat antara ekspresi *NPM1* dengan jumlah *blast*, terlihat bahwa semakin tinggi ekspresi *NPM1* semakin tinggi jumlah *blast* dengan $p < 0,05$ dan $r = 0,828$.

Penelitian ini didapatkan rerata *blast* sebesar 45,48% dengan standar deviasi 15,01% serta nilai minimum 25% dan nilai maksimum 80%. Jumlah *blast* ini lebih tinggi bila dibandingkan dengan jumlah *blast* normal pada sum-sum tulang yaitu 0 - 1%. Akl *et al* (2012) di Yunani, penelitian terhadap pasien LMA didapatkan rerata *blast* 83.5%, dengan nilai minimum 50% dan maksimum 95%.³⁴ Hasil

penelitian Haferlach *et al* (2012) didapatkan rerata *blast* sebesar 60,6%, dengan nilai minimum 20% dan maksimum sebesar 88%.⁴⁷ Hasil penelitian Mawaly *et al* (2013) didapatkan rerata *blast* lebih tinggi dari penelitian ini yaitu sebesar 72%, dengan nilai minimum 26% dan nilai maksimum 85%. Zidan *et al* (2013) di Mesir, penelitian terhadap pasien LMA didapatkan rerata *blast* 75%, dengan nilai minimum 61% dan maksimum 89%.⁴² Penelitian oleh Hasserjian *et al* (2014) terhadap 571 pasien LMA ditemukan *blast* $\geq 30\%$ sebanyak 429 pasien. Penelitian Yoshida *et al* (2016) di Jepang pada pasien LMA mendapatkan rerata *blast* sebesar 89%.⁴³

Hasil pada penelitian Luo *et al* (2010) di Amerika, terdapat korelasi positif antara ekspresi *NPM1* dengan jumlah *blast* pada pasien LMA dengan korelasi kuat yang bermakna secara signifikan dengan $p < 0.001$.⁴⁷ Penelitian lain oleh Dhahir *et al* (2012) di Iraq, pasien LMA yang mengalami mutasi *NPM1* mengalami peningkatan *blast* yang signifikan dibanding tanpa mengalami mutasi.⁵² Penelitian oleh Leibundgut *et al* (2012) di Swiss, pasien LMA yang mengalami mutasi *NPM1* mengalami peningkatan jumlah *blast* yang lebih signifikan dibanding tanpa mengalami mutasi.⁵³ Hasil ini sesuai dengan penelitian Liu *et al* (2013) di Cina mendapatkan hubungan antara ekspresi *NPM1* dengan peningkatan jumlah *blast* dengan $p < 0,01$.⁴⁸ Hasil penelitian ini sama dengan penelitian Jo *et al* (2016) di Korea mendapatkan korelasi kuat yang bermakna secara signifikan antara ekspresi *NPM1* dengan peningkatan jumlah *blast* dengan $p < 0.001$ dan $r = 0.710$.⁵⁰

Secara umum dapat kita lihat bahwa terdapat peningkatan jumlah *blast* pada pasien LMA dengan berbagai variasi nilai, tergantung pada besar dan teknik pengambilan sampel penelitian. Menurut literatur leukositosis terjadi pada lebih dari 75% kasus LMA, meskipun sebagian kecil mempunyai angka leukosit yang normal, dan ditemukan sel-sel *blast* dalam jumlah yang signifikan dalam sel-sel darah tepi

pada lebih dari 85% kasus LMA. Leukemia mieloid akut dapat menunjukkan gejala klinis yang sangat heterogen ditandai dengan proliferasi *blast* yang cepat dan dapat menunjukkan gejala klinis yang tiba-tiba. Gen *NPM1* diekspresikan pada tingkat tinggi dalam beberapa spektrum keganasan hematologik dan paling banyak ditemukan pada pasien LMA, yaitu sekitar 93%. Peningkatan ekspresi *NPM1* ini berperan penting dalam kelangsungan hidup, pertumbuhan dan proliferasi sel *blast*. Beberapa studi telah menunjukkan bahwa mutasi *NPM1* berhubungan erat dengan peningkatan jumlah leukosit, *blast* dalam sum-sum tulang dan darah perifer. Mutasi *NPM1* pada pasien LMA ini juga berhubungan dengan peningkatan remisi komplit, respon terhadap kemoterapi dan *outcome* yang baik.³³

6.4. Hubungan ekspresi *NPM1* dengan hipertropi gingiva pada pasien LMA

Hasil penelitian ini didapatkan rerata ekspresi *NPM1* berdasarkan hipertropi gingiva positif dan negatif secara berturut-turut yaitu sebesar $31,3 \times 10^7$ *copies/ml* dan $9,6 \times 10^7$ *copies/ml*. Uji statistik untuk menilai ekspresi *NPM1* terhadap hipertropi gingiva pada LMA menggunakan uji beda didapatkan perbedaan yang bermakna $p < 0,05$. Terdapat perbedaan yang bermakna antara ekspresi *NPM1* pada pasien LMA yang mengalami hipertropi gingiva positif dibandingkan dengan hipertropi gingiva negatif.

Penelitian oleh Dhahir *et al* (2012) di Irak, ekspresi *NPM1* berhubungan erat dengan kejadian hipertropi gingiva sekitar 30% dari semua kasus LMA. Mutasi pada *NPM1* memiliki prognosis baik yang ditandai berkurangnya manifestasi hipertropi gingiva dengan respon komplit setelah dilakukan kemoterapi.⁵² Penelitian oleh Shammimul *et al* (2015) di India, ekspresi *NPM1* sering terjadi pada pasien LMA yang mengalami hipertropi gingiva 88,9% dibanding negatif 11,1%.⁵⁶ Penelitian oleh Davoudi *et al* (2015) di Iran, ekspresi *NPM1* sering meningkat pada

LMA mengalami hipertropi gingiva positif. Apabila sel progenitor mieloid mengalami stres karsinogenik/ leukomogenik, maka sel akan mengalami mutasi berbagai macam gen. Gen *NPM1* merupakan gen yang paling sering bermutasi dan dominan di nucleolus sel. *NPM1* akan mengalami overekspresi dan meningkatkan aktifitas berbagai macam tumor supresi lain seperti *P53*, *ARF* dan *MDM2*. Peningkatan tumor supresi tersebut akan meningkatkan proliferasi sel, sehingga terjadi peningkatan leukosit dan *blast*. Akibat infiltrasi leukosit dan *blast* di jaringan gingiva maka akan mengakibatkan terjadinya hipertropi gingiva yang merupakan keadaan klinis terpenting untuk menduga suatu LMA. Hipertropi gingiva akan mengalami respon komplis sekitar 80% dapat terjadi setelah dilakukan kemoterapi yang ditandai dengan berkurangnya manifestasi hipertropi gingiva.^{16,17} Penelitian lain oleh Guan *et al* (2015) di New Zealand dimana ekspresi *NPM1* sering meningkat pada LMA yang mengalami kejadian hipertropi gingiva positif sebesar 60% sedangkan negatif 40%. Hipertropi gingiva disebabkan oleh adanya infiltrasi sel leukemia di jaringan gingiva, dimana ukurannya makin bertambah jika terjadi peningkatan jumlah leukosit.⁵⁷ Penelitian lain oleh Chang *et al* (2016) di Pakistan, ekspresi *NPM1* sering meningkat pada LMA yang mengalami hipertropi gingiva positif 65% dan negatif 35%.⁵⁸

6.5. Keterbatasan Penelitian

Pada penelitian ini tidak menyingkirkan mutasi gen yang lainnya selain *NPM1* pada pasien leukemia mieloid akut.