

**PERBANDINGAN ANTARA PERSENTASE SEL T CD4+ DAN
SEL T HELPER 17 PADA KULTUR PERIPHERAL BLOOD
MONONUCLEAR CELL PASIEN AUTOIMMUNE HEMOLYTIC ANEMIA
DENGAN KONTROL NORMAL**

TUGAS AKHIR

**Diajukan Guna Melengkapi Tugas-tugas dan Untuk Memenuhi Salah Satu Syarat
Memperoleh Gelar Dokter Spesialis Penyakit Dalam**



Oleh:

dr. Rokhma Maisyaroh Qulsum

NIM: 17807020111010

**PROGRAM PENDIDIKAN DOKTER SPESIALIS ILMU PENYAKIT DALAM
FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS BRAWIJAYA**

RUMAH SAKIT UMUM dr. SAIFUL ANWAR MALANG

2021

**PERBANDINGAN ANTARA PERSENTASE SEL T CD4+ DAN
SEL T HELPER 17 PADA KULTUR PERIPHERAL BLOOD
MONONUCLEAR CELL PASIEN AUTOIMMUNE HEMOLYTIC ANEMIA
DENGAN KONTROL NORMAL**

TUGAS AKHIR

**Diajukan Guna Melengkapi Tugas-tugas dan Untuk Memenuhi Salah Satu Syarat
Memperoleh Gelar Dokter Spesialis Penyakit Dalam**



Oleh:

dr. Rokhma Maisyaroh Qulsum

NIM: 178070201111010

Pembimbing:

Dr. dr. Shinta Oktya Wardhani, SpPD-KHOM

Dr. dr. Maimun Zulhaidah Arthamin, MKes, SpPK (K)

**PROGRAM PENDIDIKAN DOKTER SPESIALIS ILMU PENYAKIT DALAM
FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS BRAWIJAYA
RUMAH SAKIT UMUM dr. SAIFUL ANWAR MALANG**

2021



LEMBAR PENGESAHAN KARYA AKHIR

PERBANDINGAN PERSENTASE SEL T CD4+ DAN SEL T HELPER 17 PADA KULTUR PERIPHERAL BLOOD MONONUCLEAR CELL PASIEN AUTOIMMUNE HEMOLYTIC ANEMIA DENGAN KONTROL NORMAL

Oleh:

Rokhma Maisyarah Qulsum
NIM: 178070201111010

Dibacakan Pada: Universitas Brawijaya
29 Desember 2021

Menyetujui,

Dr. dr. Shinta Oktia Wardhani, SpPK-KHCM
NIP. 19771013 200912 2 002

Dr. dr. Maimun Zuhaidah Arhanan, SpPK (K)
NIP. 19700526 199702 2 005

Dr. dr. Alma Gunawan, SpPD-KGH
NIP. 19651005 199503 1 004

Dr. Dioko Hari H, SpPD-KHICaI
NIP. 19630425 198912 1 001

Penguji III

Dr. dr. D. Singgih Wahono, SpPD-KR
NIP. 19671101 199703 1 004

Ketua Program Studi

Dr. Bogi Pratomo W, SpPD-KGIF
NIP. 19700127 199901 1 001

PERNYATAAN ORISINALITAS TESIS

Saya menyatakan dengan sebenar-benarnya bahwa sepanjang pengetahuan saya, di dalam naskah TESIS ini tidak terdapat karya ilmiah yang diajukan oleh orang lain untuk memperoleh gelar akademik di suatu Perguruan Tinggi, dan tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan orang lain, kecuali yang secara tertulis dikutip dalam naskah ini dan disebutkan dalam sumber kutipan dan daftar pustaka. Apabila ternyata di dalam naskah TESIS ini dapat dibuktikan terdapat unsur-unsur PLAGIASI, saya bersedia TESIS ini digugurkan, serta diproses sesuai dengan peraturan perundang-undangan yang berlaku.

Malang, 29 Desember 2021

Mahasiswa,

Nama : Rokhma Maisyarah Qulsum

NIM : 178070201111010

PS : Pendidikan Dokter Spesialis

Ilmu Penyakit Dalam

Fak : Kedokteran UB



KATA PENGANTAR

Segala puji dan syukur kepada Tuhan Yang Maha Kuasa atas segala rahmat dan karunia-Nya sehingga karya akhir dengan judul **“Perbandingan antara Persentase Sel T CD4+ dan Sel T Helper 17 pada Kultur Perifer Blood Mononuclear Cell pada pasien Autoimmune Hemolytic Anemia dengan Kontrol Normal”** ini dapat diselesaikan.

Ucapan terima kasih dan penghargaan setinggi-tingginya kami sampaikan kepada semua pihak yang telah berjasa dalam pelaksanaan penelitian ini, antara lain kepada :

1. Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang, Dr. dr. Wisnu Barlianto, Msi.Med, SpA(K) yang memberikan kesempatan kami untuk melakukan penelitian ini.
2. Direktur RSUD dr. Saiful Anwar Malang Dr. dr. Kohar Hari Santoso, SpAn, KIC KAP yang memberikan kesempatan kami untuk melakukan penelitian ini
3. dr. Djoko Heri Hermanto, SpPD, K-HOM, FINASIM selaku Kepala Departemen/ SMF Ilmu Penyakit Dalam Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya/RSUD dr. Saiful Anwar Malang.
4. dr. Bogi Pratomo, SpPD, K-GEH selaku Ketua Program Studi dan Dr. dr. C. Singgih Wahono, SpPD-KR selaku Sekretaris Program Studi Pendidikan PPDS Ilmu Penyakit Dalam Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya/RSUD dr. Saiful Anwar Malang.
5. Dr. dr. Shinta Oktya Wardhani, SpPD-KHOM dan Dr. dr. Maimun Zuhaidah Arthamin, M.Kes, SpPK(K) selaku pembimbing penelitian yang senantiasa



mengarahkan, memotivasi, dan memberikan jalan keluar atas permasalahan yang muncul dalam proses pengerjaan penelitian ini.

6. Mbak Heni, Mas Yudha, Mbak Tanti dan laboran lainnya yang berperan penting dalam proses penelitian ini

7. dr. Achmad Rifai, SpPD selaku Dokter Pembimbing Akademik yang dengan penuh kesabaran membimbing saya selama menjalani Pendidikan.

8. Prof. Dr. dr. Handono Kalim, SpPD, K-R, FINASIM, Prof. dr. Djoko Wahono Soeatmadji, SpPD, K-EMD, Prof. Dr. dr. Djanggan Sargowo, SpPD, SpJP(K),

(Aim) Prof. Dr. dr. Harijono Achmad, SpPD, K-GEH, Prof. Dr. dr. A. Rudijanto, SpPD, K-EMD, dr. Gatot Ismanoe, SpPD, K-PTI, dr. Budi Darmawan

Machsoos, SpPD, K-HOM, FINASIM, Dr. dr. Atma Gunawan, SpPD, K-GH, Dr. dr. Nursamsu, SpPD, K-GH, dr. BP Putra Suryana, SpPD, K-R, Dr. dr.

Cesarius Singgih Wanono, SpPD, K-R, FINASIM, dr. Sri Sunarti, SpPD, K-Ger, dr. Gadis Nurlaila M., SpPD, dr. Laksmi Sasiarini, SpPD, K-EMD, dr. Didi

Candradikusuma, SpPD, K-PTI, Dr. dr. Supriono, SpPD, K-GEH, dr. Syifa Mustika, SpPD, K-GEH, dr. Rull Rosandi SpPD, K-EMD, dr. Shinta Oktya

Wardhani, SpPD, K-HOM, dr. Achmad Rifa'i, SpPD, dr. Heri Sutanto, SpPD, dr. Muhammad Anshory, SpPD, dr. Perdana Aditya, SpPD, dr. Siti Fatma,

SpPD, dr. Nina Nur Arifah, SpPD dan dr. Rinandi Reza Brahmantya, SpPD atas segala saran, masukan dan bimbingannya selama saya menempuh

pendidikan PPDS-I Ilmu Penyakit Dalam Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya/RSUD dr. Saiful Anwar Malang.

9. Seluruh sekretaris Departemen, Divisi dan Program Studi Ilmu Penyakit Dalam yaitu, Mbak Sari, Mbak Aini, Mbak Lucky, Mbak Thia, Mbak Winda,

Mbak Heni, Mbak Eme, Mbak Desi, Mbak Datik, Mbak Riska, Mbak Silmi,



Mbak Laili, Mbak Denis, Mbak Arin, Mbak Mayang, Mbak Ajeng, Mbak Rosi, Mbak Ita, Bu Ketut dan karyawan lainnya yang turut membantu saya selama saya menjalani Pendidikan

10. Rasa hormat, cinta, syukur, serta sujud saya kepada kedua orang tua saya

Bapak Kamsoceriyadi, Ibu Sukanti serta mertua saya Bapak Suroto dan (Alm) Ibu Lilik Sumarlik yang selalu memberikan restu, doa, dan dukungan tiada henti.

11. Suami saya tercinta Lutfi Suryo Waskito, S.Psi serta ananda Aisyah Ayundyia

Putri Suryo tersayang, terima kasih atas kesabaran, kesetiaan dan segala cinta serta doa penyemangat selama saya menjalani pendidikan

12. Saudara kandung saya, Fitri Rotiqoh, Siti Roknayatun Nuhaini, Khustun Fatimah, Aminuddin Rizal

13. Rekan sejawat penelitian saya dr. Eriko Septananda Saifillah, dr. Dian Luminto, dr. Intan Merdekadini Ginting, Resvina, Anis, Osa, Farisa atas kerjasamanya dalam melakukan penelitian ini.

14. dr. Arum Gladys Kusumaningrum, dr. Dewi Sri Wulandari, dr. Eriko Septananda Saifillah, dr. Ellisma Swandini Nugraheni, dr. Ema Dianita Mayasari, dr. Galih Dwi Jayanto, dr. Ramadi Satrio Wicaksono, dr. Ratna Adelia Pravitarsari, dr. Siwastuastri Usa Paramitha sebagai teman seperjuangan PPDS Ilmu Penyakit Dalam Angkatan 42

15. Seluruh rekan-rekan PPDS, Dokter Muda, Perawat, Tenaga Farmasi, Ahli Gizi, dan seluruh karyawan FKUB/RSSA yang telah membantu saya menjalankan tugas sebagai PPDS IPD FKUB/RSSA serta seluruh pihak yang membantu saya mengemban pendidikan PPDS yang tidak dapat saya sebutkan satu persatu.



16. Pasien-pasien AIHA yang menjadi subjek penelitian dan semua pasien yang telah mendermakan jiwa dan raganya demi kemajuan ilmu pengetahuan di bidang Ilmu Penyakit Dalam.

17. Kementerian Kesehatan, Kementerian Pertahanan, Mabes TNI AL yang memberikan dukungan pada pendidikan dokter Spesialis saya.

18. Serta pihak-pihak lain yang penulis tidak dapat sebutkan satu persatu namun telah memberikan banyak bantuan yang berharga.

Penulis berharap semoga penelitian ini dapat memberikan manfaat bagi perkembangan Ilmu Penyakit Dalam serta kepentingan masyarakat, bangsa, dan negara. Penulis menyadari bahwa penelitian ini masih banyak kekurangan, dengan demikian penulis memohon saran dan masukan demi kesempurnaan penelitian ini.

Malang, 29 Desember 2021

dr. Rokhma Maisyarah Qulsum

**ABSTRAK**

Qisum, Rokhma Maisyaron. 2021. **Perbandingan Persentase Sel T CD4+ dan Sel T Helper 17 pada Kultur Peripheral Blood Mononuclear Cell Pasien Uatoimmune Hemolytic Anemia dengan Kontrol Normal.** Tugas Akhir Program Pendidikan Dokter Spesialis Ilmu Penyakit Dalam, Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, RSUD Dr. Saiful Anwar Malang. Pembimbing: Dr. dr. Shinta Oktya Wardhani, SpPD-KHOM, Dr. dr. Maimun Zulhaidah Arthamin, SpPK (K)

LATAR BELAKANG: Anemia hemolitik autoimun adalah kelainan langka yang ditandai oleh hemolisis, yaitu pemecahan sel darah merah yang terjadi oleh proses autoantibodi dan/atau komplemen, bersama dengan makrofag yang diaktifkan, limfosit T dan sitokin yang semuanya berkontribusi pada prosesnya. Mekanisme yang terlibat dalam kegagalan toleransi pusat dan perifer dalam perkembangan AIHA sebagian besar masih belum diketahui. Limfopenia diketahui berperan dalam kejadian autoimun, demikian juga dengan sel T Helper 17 diketahui memiliki peran dalam patogenesisnya.

METODE: Penelitian ini menggunakan desain observasional case control di laboratorium secara *in vitro* pada kultur peripheral blood mononuclear cell (PBMC) pada kelompok sampel pasien AIHA dan subjek normal. Pada penelitian ini akan dievaluasi persentase sel T CD4+ dan sel Th17 dengan flowsitometri. Uji normalitas dengan metode *saphiro wilk*. Perbedaan antara kelompok dianalisis dengan independet students t-test/Mann Withney dengan tingkat kebermaknaan $p < 0,05$. Hasil dari analisa tersebut dilanjutkan dengan uji korelasi regresi linear.

HASIL: Rerata persentase sel T CD4+ antara kelompok yang diuji dengan metode *Mann Withney* memiliki perbedaan signifikan (nilai $p=0,000$) dengan hasil Mean \pm SD, T CD4+ KN $0,292 \pm 0,024$ KP $0,261 \pm 0,006$. Bila dibandingkan dengan KN terdapat penurunan sel T CD4+ pada kelompok AIHA.. Rerata persentase Th17 antara kelompok yang diuji dengan independent t-test tidak memiliki perbedaan bermakna dengan hasil Mean \pm SD, Th17 KN $0,615 \pm 0,053$ KP $0,652 \pm 0,042$.

KESIMPULAN: Persentase sel T CD4+ pada pasien AIHA lebih rendah dibandingkan subjek normal. Tidak ada perbedaan yang bermakna pada persentase sel Th17 pada kedua kelompok.

KATA KUNCI: Sel T CD4+, sel T Helper 17, sel darah merah, AIHA

**ABSTRACT**

Qulsum, Rokhma Maisyarah. 2021. **Comparison of The Percentage of CD4+ T Cells and T Helper 17 Cells in Peripheral Blood Mononuclear Cell Cultures in Patients with Autoimmune Hemolytic Anemia Compared to Normal Subjects.** Final Assignment, Resident Doctor of Speciality Programme in Internal Medicine, Department of Internal Medicine, Dr. Saiful Anwar General Hospital, Faculty of Medicine Universitas Brawijaya, Malang. Supervisor: Dr. dr. Shinta Oktya Wardhani, SoPD-KHOM, Dr. dr. Maimun Zulhaidah Arthamin, SpPK (K)

BACKGROUND: Autoimmune hemolytic anemia is a rare disorder characterized by hemolysis, the breakdown of red blood cells that occurs by autoantibody and/or complement processes, together with activated macrophages, T lymphocytes and cytokines all of which contribute to the process. The mechanisms involved in the failure of central and peripheral tolerance in the development of AIHA remain largely unknown. Lymphopenia is known to play a role in autoimmune events, as well as Th17 is known to have a role in its pathogenesis.

METHOD: This study used a case-control observational design in the laboratory in vitro on peripheral blood mononuclear cell (PBMC) culture in the sample group of AIHA patients and normal subjects. In this study, the percentage of CD4+ T cells and Th17 will be evaluated by flow cytometry. Normality test using the saphiro wilk method. Differences between groups were analyzed by independent students t-test/Mann Withney with a significance level of $p < 0.05$. The results of the analysis are followed by a linear regression correlation test

RESULTS: The mean percentage of CD4+ T cells between the groups tested using the Mann Withney method had a significant difference (p value=0.000) with the results Mean \pm SD, T CD4+ KN 0.292 ± 0.024 KP 0.261 ± 0.006 . When compared with KN, there was a decrease in CD4+ T cells in the AIHA group. The mean percentage of Th17 between the groups tested by independent t test had no significant difference with the results Mean \pm SD, Th17 KN 0.615 ± 0.053 KP 0.652 ± 0.042 .

CONCLUSION: The percentage of CD4+ T cells in AIHA patients was lower than in normal subjects. There was no significant difference in the percentage of Th17 in the two groups.

KEYWORDS: CD4+ T cells, T Helper 17 cells, red blood cells, AIHA



DAFTAR ISI

HALAMAN PENGESAHAN	iii
PERNYATAAN ORISINALITAS TESIS	iv
KATA PENGANTAR	v
ABSTRAK	ix
ABSTRACT	x
DAFTAR ISI	xi
DAFTAR TABEL	xiv
DAFTAR GAMBAR	xv
DAFTAR SINGKATAN	xvii
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1. Latar Belakang	1
1.2. Rumusan Masalah	4
1.3. Tujuan Penelitian	4
1.3.1. Tujuan Umum	4
1.3.2. Tujuan Khusus	4
1.4. Manfaat Penelitian	5
1.4.1. Manfaat Akademis	5
1.4.2. Manfaat Praktis	5
BAB II TINJAUAN KEPUSTAKAAN	6
2.1. Autoimmune Hemolytic Anemia (AIHA)	6
2.1.1. Definisi	6
2.1.2. Epidemiologi	9
2.1.3. Etiologi dan Faktor Predisposisi	10
2.1.3.1 Predisposisi Genetik	11
2.1.3.2 Jenis kelamin dan usia	12
2.1.3.3 Agen Infeksi	12
2.1.3.4 Obat	13
2.1.3.5 Neoplasia	13
2.1.4 Klasifikasi	14



2.1.4.1 AIHA tipe hangat.....	16
2.1.4.1 terkait obat.....	18
2.1.4.2 sindrome evans.....	20
2.1.4.2 AIHA tipe dingin.....	20
2.1.4.3 Mixed AIHA.....	23
2.1.4.4 Paroxysmal Cold Hemoglobinuria.....	24
2.1.4.5 AIHA Atipikal.....	26
2.1.5 Diagnostik klinis.....	26
2.1.6 Patofisiologi.....	30
2.1.6.1 Mekanisme patogenik penghancuran RBS.....	30
2.1.6.2 Latar belakang genetik dalam pathogenesis AIHA.....	32
2.1.6.3 Mekanisme imunologi pathogenesis AIHA.....	32
2.1.6.3 Disregulasi sitokin di AIHA.....	35
2.1.7 Penatalaksanaan terapi.....	37
2.1.7.1 Tranfusi darah.....	37
2.1.7.2 Kortikosteroid.....	39
2.1.7.3 Terapi target saat ini dan yang sedang dikembangkan....	41
2.2 Mekanisme Imun Hilangnya Toleransi Self.....	51
2.2.1 Toleransi Sentral.....	52
2.2.2 Toleransi Perifer.....	52
2.3 Sel T CD4+ Dalam Imunitas dan Autoimunitas.....	54
2.4 Sel T Helper 17 dan Interleukin 17.....	58
2.4.1 Peran Sel T Helper dan Interleukin 17 dalam AIHA.....	63
BAB III KERANGKA TEORI, KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN	66
3.1. Kerangka Teori.....	66
3.2. Kerangka Konsep.....	67
3.3. Hipotesis Penelitian.....	69
BAB IV METODE PENELITIAN.....	70
4.1. Rancangan Penelitian.....	70
4.2. Populasi dan Subjek Penelitian.....	70
4.3. Kriteria Inklusi dan Eksklusi.....	71



4.4. Sampel	71
4.5. Variabel Penelitian	73
4.6. Definisi Operasional	73
4.7. Lokasi dan Waktu Penelitian	74
4.8. Alur Penelitian	75
4.9. Bahan dan Alat	75
4.10. Prosedur Penelitian	76
4.11. Pengumpulan dan Analisis Data	82
BAB V HASIL PENELITIAN	83
5.1. Karakteristik Subjek Penelitian	83
5.2. Analisa statistik.....	84
5.2.1 Uji Normalitas Uji beda (uji t)	85
5.2.2 Uji Homogenitas	86
5.2.3 Uji Beda (Uji t/Mann Whitney)	87
5.3. Perbandingan persentase sel T CD4+	87
5.4. Perbandingan persentase sel T Helper 17	88
5.6. Analisis Regresi Linier	89
BAB VI PEMBAHASAN	91
6.1. Persentase sel T CD4+ pada pasien AIHA	91
6.2. Persentase sel T Helper 17 pada pasien AIHA	93
BAB VII KESIMPULAN DAN SARAN	100
DAFTAR PUSTAKA	101
LAMPIRAN	111



DAFTAR TABEL

Tabel 2.1	Etiologi AIHA Sekunder.....	11
Tabel 2.2	Klasifikasi anemia hemolitik autoimun.....	16
Table 2.3	Gangguan atau kondisi utama yang berhubungan dengan wAIHA sekunder pada orang dewasa.....	17
Tabel 2.4	Obat-obat yang menginduksi pemberntukan antibodi.....	20
Tabel 5.1	Karakteristik subjek penelitian.....	83
Tabel 5.2	Hasil penelitian persentase sel T CD4 ⁺ dan Th17.....	85
Tabel 5.3	Hasil uji normalitas.....	85
Tabel 5.4	Hasil uji homogenitas.....	86
Tabel 5.5	Perbandingan sel T CD4 ⁺ dan Th17 berdasarkan kelompok sehat dan pasien AIHA.....	87
Tabel 5.6	Hasil Analisa regresi.....	89



DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1	Mekanisme hemolisis terjadi secara intravaskuler atau ekstravaskuler. Hemolisis intravaskuler dalam aliran darah. Hemolisis ekstravaskuler dalam sumsum tulang, limpa atau hepar	7
Gambar 2.2	Mekanisme hemolisis imun	8
Gambar 2.3	Mekanisme destruksi eritrosit pada wAIHA	18
Gambar 2.4	Penghancuran eritrosit pada <i>cold agglutinin disease</i>	23
Gambar 2.5	Destruksi eritrosit imun, diperantarai-komplemen, pada <i>paroxysmal cold hemoglobinuria</i> (PCH) menunjukkan optimum suhu <i>biphasic</i>	25
Gambar 2.6	<i>Direct Antiglobulin Test</i> (DAT) dan <i>Indirect Antiglobulin Test</i> (IAT) ..	28
Gambar 2.7	Mekanisme pathogenesis destruksi sel darah merah	31
Gambar 2.8	Faktor imunologis, lingkungan dan genetik yang terlibat dalam pathogenesis anemia hemolitik autoimun (AIHA)	35
Gambar 2.9	Disregulasi sitokin pada AIHA	36
Gambar 2.10	Pembentukan dan fungsi subset-subset Th	58
Gambar 2.11	Pensinyalan reseptor interleukin 17	61
Gambar 2.12	Diferensiasi sel Th17	63



Gambar 3.1	Kerangka Teori	66
Gambar 3.2	Kerangka Konsep	67
Gambar 4.1	Alur penelitian	75
Gambar 4.2	Isolasi PBMC	77
Gambar 5.1	Diagram scatter salah satu pasien penelitian	84
Gambar 5.2	Histogram rata-rata sel CD4+	88
Gambar 5.3	Histogram rata-rata sel Th17	89
Gambar 5.4	Pengaruh sel T CD4+ terhadap Th17	90



DAFTAR SINGKATAN

Ab = *antibody*

AIHA = *autoimmune hemolytic anemia*

ADCC = *antibody dependent cell-mediated cytotoxicity*

APCs = *antigen-presenting cells*

C = *complement*

CAD = *Cold Agglutination Disease*

CD = *cluster of differentiation*

CLL = *Chronic Lymphocytic Leukemia*

CTLA-4 = *cytotoxic T lymphocyte antigen 4*

DAT = *Direct Agglutination Test*

DC = *Dendritic cell*

IFN γ = *Interferon gamma*

IL = *Interleukin*

LES = *lupus eritematosus sistemik*

NO = *nitric oxide*

NHL = *Non Hodgkin Lymphoma*

HLA = *Human Leucocyte Antigen*

NK = *Natural killer*

PBMCs = *peripheral blood mononuclear cells*



PCH = *paroxysmal cold hemoglobinuria*

PMP = *platelet microparticles*

PS = *phosphatidyl serine*

RBC = *red blood cell*

TCR = *T cell receptor*

Teffs = *sel-sel T efektor*

TF = *tissue factor*

TGF = *tumor growth factor*

Th = *T helper*

TNF = *Tumor necrotizing factor*

WAIHA = *warm autoimmune hemolytic anemia*



BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Anemia hemolitik autoimun (*Autoimmune hemolytic anemia* = AIHA) merupakan suatu kelainan langka yang ditandai dengan hemolisis, yaitu pemecahan sel darah merah yang terjadi dengan autoantibodi dan/atau komplemen, bersama dengan makrofag yang diaktifkan, limfosit T dan sitokin yang semuanya berkontribusi pada proses (Michalak, *et al.*, 2020).

AIHA termasuk penyakit autoimun yang cukup jarang, diperkirakan kejadian 0,8–3 kasus / 100.000 orang dewasa setiap tahun dan hanya 0,2-0,4 kasus / 100.000 per tahun untuk bayi dan anak-anak. Penyakit ini adalah kelainan yang serius dan seringkali mengancam nyawa, dengan angka kematian yang mencapai 11% pada orang dewasa (Niss and Ware, 2018). Meskipun insidensi AIHA relatif rendah, penyakit ini menyebabkan anemia yang mengancam jiwa dengan onset cepat, dengan tingkat kematian yang tinggi sebesar 11,2% (Xu, *et al.*, 2012).

Data pasien AIHA dewasa dan anak di RSUD dr Saiful Anwar Malang berdasarkan pemeriksaan laboratorium yang dimintakan dari Januari 2012 sampai Desember 2016 di Instalasi Laboratorium Sentral menunjukkan insidensi yang cenderung meningkat dari tahun ke tahun. Insidensi pada tahun 2012 adalah sebanyak 17 kasus per 100.000 per tahun, pada tahun 2013 meningkat dua kali lipat, tahun 2014-2015 menjadi 52 kasus per 100.000 per tahun, sedangkan tahun 2016,



63 kasus per 100.000 per tahun. Perbandingan antara perempuan dan laki-laki adalah 2-3 : 1 (Arthamin, komunikasi personal)

Seperti halnya sebagian besar penyakit autoimun yang lainnya, penyebab timbulnya AIHA adalah faktor-faktor genetik dan lingkungan. Faktor-faktor lingkungan yang sudah diketahui antara lain, infeksi bakteri, virus, fungal, bahan-bahan kimia tertentu – termasuk beberapa herbal –, stres psikis dan fisik, antibiotik dan berbagai jenis obat lain yang semakin lama semakin bertambah panjang daftarnya (Friedberg, 2014)

Patogenesis AIHA, termasuk defek imunologi, sebagian besar masih belum jelas. Bentuk AIHA yang paling umum ditandai dengan adanya autoantibodi jenis "hangat", yang merupakan tipe IgG dan bereaksi secara optimal pada suhu 37 C, menyebabkan kerusakan sel darah merah ekstravaskular oleh makrofag jaringan.

Seperti yang telah diketahui bahwa sel T CD4⁺ sangat penting untuk menyediakan membantu sel B yang mengarah ke produksi patogen autoantibodi IgG, dan karena itu mereka menjadi target imunoterapi. Sampai beberapa tahun lalu, sel T CD4⁺ helper (Th) dibagi lagi menjadi dua subset utama sel T, disebut subset Th1 dan Th2. Namun, penemuan sel Th17 baru-baru ini memerlukan evaluasi ulang dari bias Th patogenik yang relevan dalam autoimunitas. Sel Th17, yang ditandai dengan sekresi interleukin (IL) -17, sekarang telah diidentifikasi sebagai kunci sel efektor dalam pembersihan patogen ekstraseluler dan dalam perkembangan banyak penyakit autoimun. Pada AIHA, IL-17 yang disekresikan oleh sel Th17 responsif untuk sel darah merah autoantigen dapat dideteksi pada pasien (Xu, et al., 2012).



Presentasi klinis dan pengobatan AIHA dipengaruhi oleh banyak faktor, termasuk jenis AIHA, derajat hemolisis, penyakit yang mendasari, adanya penyakit penyerta, kemampuan kompensasi sumsum tulang dan adanya fibrosis dan diserthropoiesis. Perawatan utama untuk AIHA adalah berdasarkan penghambatan produksi autoantibodi dengan terapi tunggal atau kombinasi. Pengurangan kerusakan sel darah merah melalui splenektomi saat ini merupakan pengobatan lini ketiga untuk AIHA tipe hangat. Perawatan suportif termasuk suplementasi vitamin, eritropoietin rekombinan, profilaksis trombosis dan pencegahan serta pengobatan infeksi sangat penting. Kelompok obat baru yang menghambat respon kekebalan di berbagai tingkat sedang dikembangkan secara intensif, termasuk penghambatan fagositosis sel darah merah yang dimediasi antibodi, penghambatan frekuensi dan aktivitas sel B dan sel plasma, penghambatan daur ulang IgG, imunomodulasi fungsi limfosit T, dan penghambatan kaskade komplemen. Penelitian terbaru telah membawa perubahan dalam klasifikasi dan kemajuan dalam memahami patogenesis dan pengobatan AIHA, meskipun masih banyak masalah yang harus diselesaikan, terutama yang berkaitan dengan dampak usia terhadap perubahan kekebalan (Michalak, *et al.*, 2020).

Meskipun mungkin ada beberapa faktor yang berkontribusi terhadap induksi AIHA, data menunjukkan bahwa gangguan jumlah dan aktivitas dari sel T CD4+ dan subsetnya sel Th17, dalam hal ini IL 17 dapat memainkan peran penting dalam onset dan/atau pemeliharaan penyakit autoimun ini. Terapi saat ini untuk AIHA termasuk pemberian obat immunosupresif bersama dengan transfusi atau splenektomi pada pasien dengan kasus yang kambuh, bersifat mengendalikan, daripada



menyembuhkan penyakit. Potensi imunoterapi mungkin merupakan strategi yang lebih efektif untuk pengobatan AIHA.

1.2 Rumusan Masalah

1.2.1 Rumusan Masalah Umum

Apakah terdapat perbedaan persentase sel T CD4+ dan sel Th17 antara pasien AIHA dengan subjek normal.

1.2.2 Rumusan Masalah Khusus

1. Apakah terdapat perbedaan persentase sel T CD4+ antara pasien AIHA dengan subjek normal?
2. Apakah terdapat perbedaan persentase sel Th17 antara pasien AIHA dengan subjek normal?

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan umum

Mengetahui peran sel T CD4+ dan sel Th17 pada AIHA

1.3.2 Tujuan khusus

1. Mengetahui perbedaan persentase sel T CD4+ pada pasien AIHA dan subjek normal.
2. Mengetahui perbedaan persentase sel Th 17 pada pasien AIHA dan subjek normal



1.4 Manfaat Penelitian

1.4.1 Manfaat Akademis

Menjadi dasar ilmiah dalam bidang Heratologi dan Imunologi mengenai perbedaan persentase antara sel T CD4 dan sel Th17 antara pasien AIHA dan populasi normal.

1.4.2 Manfaat Praktis

Dengan diketahuinya perbedaan antara sel T CD4⁺ dan sel Th17 antara pasien AIHA dan populasi normal, diharapkan dapat diketahui korelasi dan memberikan potensi imunoterapi pada pasien AIHA.



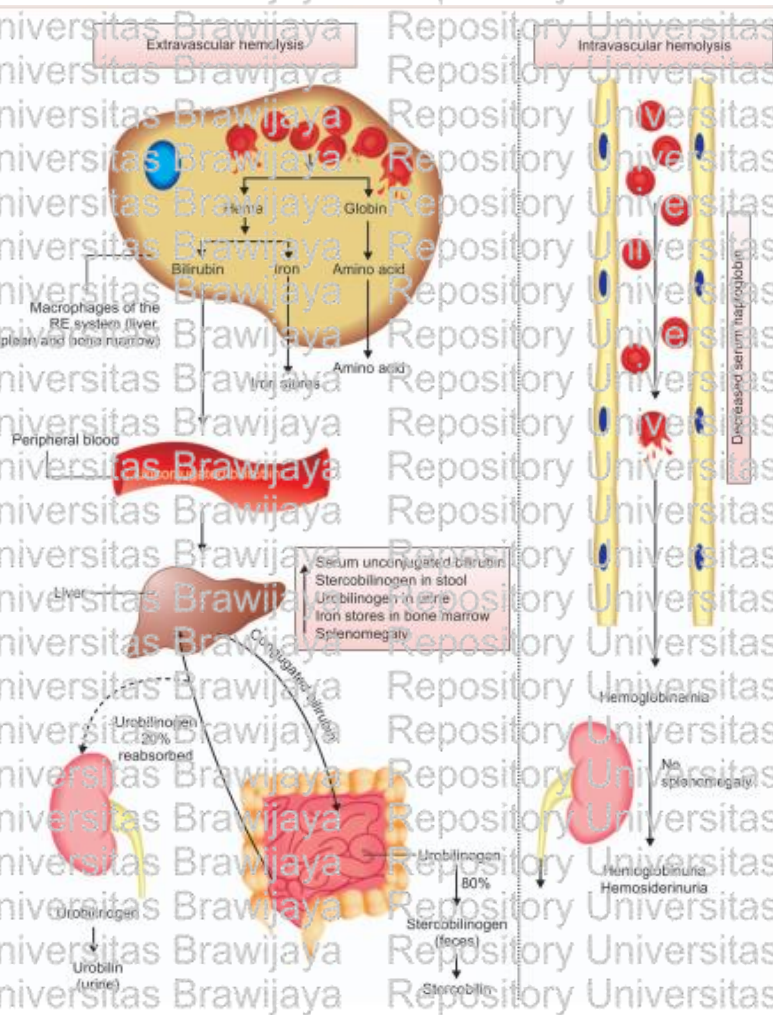
BAB II TINJAUAN KEPUSTAKAAN

2.1 Autoimmune Hemolitik Anemia (AIHA)

2.1.1 Definisi

Anemia hemolitik autoimun (*Autoimmune Hemolytic Anemia (AIHA)*) didefinisikan sebagai peningkatan penghancuran sel darah merah dengan adanya autoantibodi anti-RBC dengan atau tanpa aktivasi komplemen (Hill and Hill, 2018)

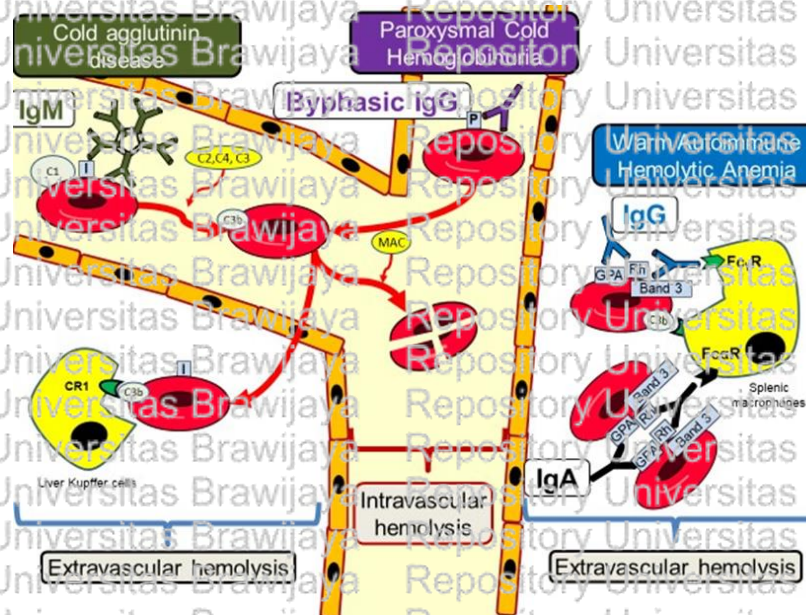
Autoimmune Hemolytic Anemia (AIHA) adalah contoh klasik hipersensitivitas tipe II, dengan sel darah merah yang dilapisi autoantibodi akan dikeluarkan dari sirkulasi oleh fagosit dari sistem retikulo-endotelial (RES), makrofag limpa, dan/atau lisin dengan fiksasi komplemen (Packman, 2015). Anemia terjadi jika hemolisis tidak diimbangi dengan peningkatan produksi sel darah merah. Mekanisme hemolisis bergantung terhadap tipe autoantibodi (Zhuang *et al.*, 2009; Stevens, 2010; Jäger and Lechner, 2013). Penghancuran eritrosit secara prematur diperantarai oleh autoantibodi IgG, IgM, dan komplemen, sedangkan mekanismenya melalui aktifasi sistem komplemen, aktifasi mekanisme seluler, atau kombinasi keduanya (Hudnall, 2012). Mekanisme hemolisis dapat terjadi secara intravaskuler dan ekstrasvaskuler, seperti yang ditunjukkan pada gambar 2.1



Gambar 2.1 Mekanisme hemolisis bisa terjadi secara intravaskular atau ekstrasvaskular. Hemolisis intravaskular terjadi dalam aliran darah. Hemolisis ekstrasvaskular terjadi dalam sumsum tulang, limpa atau hepar (Nayak, 2012).

Lebih dari 50% pasien AIHA ada kaitan dengan penyakit yang mendasarinya atau AIHA sekunder, diantaranya: 18% kasus limfoma berkembang menjadi AIHA, 10% kasus lupus eritematosus sistemik (LES) berkembang menjadi AIHA dan dapat ditemukan pada beberapa penyakit lainnya termasuk leukemia limfoblastik kronik, *Waldenström's macroglobulinemia*. Sedangkan AIHA primer atau AIHA idiopatik

penyakit yang mendasarinya tidak diketahui, dan 65% dari AIHA primer terjadi pada wanita (Zeerleder, 2011). Sebanyak 48-70% AIHA adalah AIHA tipe hangat (*warm* AIHA), sedangkan AIHA tipe dingin (*cold* AIHA) yang terdiri dari *cold agglutinin syndrome* (CAS) ditemukan 16%-32% dari kasus AIHA dan AIHA karena bifasik autoantibodi (*paroxysmal cold hemoglobinuria*) ditemukan 32% dari kasus AIHA, biasanya pada anak-anak, jarang orang dewasa, sedangkan AIHA karena *drug-induced* ditemukan 12-13% dari kasus AIHA. Semua tipe umum AIHA bisa akut dan sementara, atau kronis. Sebagaimana yang ditunjukkan pada gambar 2.2 mekanisme hemolisis pada beberapa tipe AIHA



Gambar 2.2 Mekanisme hemolisis imun (Gonzales, 2018)



2.1.2 Epidemiologi

Saat ini diperkirakan bahwa kejadian AIHA adalah 1,77 kasus per 100.000 per tahun, di antaranya adalah AIHA tipe hangat bentuk yang paling umum dan menyumbang sekitar 2/3 dari kasus. CAD paling umum kedua untuk sekitar 15-20% kasus AIHA. CAD biasanya terjadi pada orang berusia > 50 tahun, paling sering pada dekade ke-7 dan ke-8 kehidupan. Paroxysmal cold hemoglobinuria (PCH) jarang terjadi, penyakit yang kebanyakan menyerang anak-anak. Ini sangat luar biasa jarang terjadi pada orang dewasa dan sering dikaitkan dengan infeksi pada kelompok usia ini (Michalak, *et al.*, 2020). Pada penelitian yang lain disebutkan diperkirakan angka kejadian 0,8-3 kasus per 100.000 orang dewasa setiap tahun dan hanya 0,2-0,04 kasus per 100.000 per tahun pada kasus bayi dan anak-anak (Niss and Ware, 2018).

Risiko AIHA meningkat dengan usia, AIHA tipe hangat risikonya 5 kali lebih tinggi dalam dekade ke-7 kehidupan dibandingkan dengan dekade ke-4. Alasan utama ketergantungan usia ini bisa menjadi immunosenescence atau kelainan epigenetik terakumulasi di sel hematopoietik dengan penuaan. Proses penuaan serta berbagai penyakit penyerta meningkatkan kemungkinan dan tingkat keparahan stres oksidatif dan eryptosis, misalnya perubahan membran sel eritrosit menyebabkan penuaan dan kematiian dini sel darah merah. Latar belakang genetik, defisiensi imun, penyakit autoimun, infeksi, pengobatan terutama obat anti kanker baru, neoplasia - terutama CLL / NHL, dan transplantasi semuanya telah disarankan sebagai faktor risiko penting untuk pengembangan AIHA. Perjalanan klinis AIHA dapat bervariasi dari bentuk ringan hingga parah dan mengancam jiwa. Perjalanan AIHA mungkin kronis



atau berulang, dan, sangat jarang bisa episodik. Diperkirakan kematian pada AIHA sekitar 10% (Michalak, *et al.*, 2020)

2.1.3 Etiologi dan Faktor Predisposisi

Penyakit autoimun dihasilkan dari interaksi berbagai faktor (Vickers dan Baker, 2020). AIHA idiopatik atau primer pada ~ 50% orang dewasa dan ~ 30% kasus pediatrik. Penyakit limfoproliferatif, penyakit autoimun, dan keganasan adalah penyebab tersering AIHA sekunder pada orang dewasa, sedangkan infeksi, gangguan autoimun, dan gangguan disregulasi sistem imun adalah yang penyebab paling umum pada pediatrik. Karena lebih banyak gangguan disregulasi sistem imun dikenali dan dijelaskan pada tingkat genetik, proporsi AIHA sekunder berkembang, terutama pada pasien muda dan pasien multilineage sitopenia seperti sindrom Evans. Tabel 2.1 merangkum penyebab paling umum AIHA sekunder, berdasarkan karakteristik autoantibodi dan usia pasien. Sejarah pribadi dan keluarga yang menyeluruh, ditambah dengan pemeriksaan fisik yang cermat, harus memandu investigasi untuk penyebab yang mendasari AIHA. Identifikasi dini bentuk-bentuk sekunder ini merupakan hal bijaksana karena AIHA sekunder seringkali sulit diobati tanpa mengobati penyebab yang mendasari. AIHA karena diinduksi obat juga harus dipertimbangkan sejak dini, karena menghentikan paparan kepada agen yang melanggar seringkali cukup untuk memperbaiki masalah latar belakang genetik, jenis kelamin, usia, faktor lingkungan seperti infeksi, obat-obatan, dan neoplasia semuanya telah terlibat dalam etiologi AIHA. (Niss and Ware, 2018)



Tabel 2.1 Etiologi AIHA Sekunder (Niss and Ware, 2018)

Type of AIHA	Children	Adults
Warm AIHA	<ul style="list-style-type: none"> Evans syndrome Infections (EBV, parvovirus, mycoplasma, CMV) Primary immune deficiencies and/or immune dysregulation syndromes (CVID, ALPS, DiGeorge syndrome, CTLA-4, LRBA, IPEX, STAT3-GOF, STAT1-GOF, WAS, CID, posttransplant) Autoimmune diseases (SLE, hepatitis, thyroiditis, APS) Infantile giant cell hepatitis 	<ul style="list-style-type: none"> Malignancies (CLL, NHL, HL) Autoimmune disease (SLE, IBD, RA, APS) Infections (hepatitis C, HIV, CMV, tuberculosis) Primary immune deficiencies (CVID, ALPS)
Cold agglutinin disease	<ul style="list-style-type: none"> Infections (mycoplasma, viral infections including EBV) Posttransplantation 	<ul style="list-style-type: none"> MGUS Lymphoproliferative disease Macroglobulinemia CLL Solid tumors Autoimmune disease Posttransplant
Paroxysmal cold hemoglobinuria	<ul style="list-style-type: none"> Infections (adenovirus, influenza A, syphilis, CMV, EBV, VZV, measles, mumps, mycoplasma, E. coli) 	

2.1.3.1 Predisposisi Genetik

Kemungkinan predisposisi genetik terhadap AIHA pada manusia ditingkatkan oleh laporan penyakit familial langka. *Human leucocyte antigen* (HLA) tertentu adalah penentu genetik terkuat dari banyak penyakit autoimun, dan AIHA sangat berhubungan positif dengan HLA-DR15, dengan sekitar 60% pasien mengekspresikan alel ini. Penelitian asosiasi genom dari penyakit autoimun manusia lainnya mengungkapkan bahwa sejumlah besar gen non-HLA berkontribusi lebih lanjut terhadap kerentanan, dan kecenderungan tikus NZB untuk AIHA juga telah dikaitkan dengan beberapa lokus. Basa molekuler dari sebagian besar asosiasi tersebut masih belum diketahui. Namun, sama dengan galur rawan autoimun lainnya,



tikus NZB berbagi haplotipe promotor yaitu terkait dengan penurunan ekspresi dan fungsi penghambatan FcyR FcyRIIb. Efeknya dari polimorfisme pada FcyRIIb diekspresikan oleh makrofag dan sel B ditingkatkan fagositosis dari IgG opsonized RBC dan peningkatan respon antibodi (Vickers and Baker, 2020)

2.1.3.2 Jenis Kelamin dan Usia

Tidak seperti kebanyakan penyakit autoimun manusia lainnya, kejadian AIHA tidak lebih tinggi pada wanita daripada pria. AIHA menjadi semakin progresif dengan bertambahnya usia, mungkin mencerminkan defek pada regulasi imun (Vickers and Baker, 2020)

2.1.3.3 Agen Infeksi

Agen infeksi biasanya terlibat dalam memicu penyakit autoimun pada individu yang rentan, dengan hampir 10% dari pasien AIHA dilaporkan memiliki kondisi bersamaan dengan infeksi bakteri atau virus, dan pada suatu studi, autoantibodi RBC yang diinduksi pada tikus oleh LCMV.

Reaktivitas silang antara lipopolisakarida bakteri dan antigen golongan darah telah diusulkan menjelaskan tingginya insiden CAS sementara yang mengikuti infeksi *Mycoplasma pneumoniae* manusia. Potensi mimikri untuk menginduksi AIHA hangat dicontohkan oleh penyakit yang berkembang pada tikus berikut suntikan sel darah merah berulang yang mengekspresikan antigen reaktif silang dari spesies yang berkerabat dekat, tikus. Studi terhadap tikus NZB juga menunjukkan reaktivitas silang itu antara mikroba dan self-epitope dapat memfokuskan kecenderungan autoimunitas



ke target tertentu, bahkan bila bukan penyebab utama atau cukupnya penyakit.

Mekanisme kedua yang menghubungkan infeksi dan AIHA adalah kemampuan rangsangan mikroba bawaan dan sitokin yang mereka induksi untuk mengaktifkan *antigen presenting cell* (APC) dan oleh karena itu untuk meningkatkan imunogenisitas autoantigen sel darah merah. Perubahan lingkungan sitokin akibat infeksi, terutama produksi IFN- γ , juga dapat meningkat. Fagositosis sel darah merah dengan memodulasi subkelas autoantibodi dan aktivasi makrofag. Akhirnya, agen infeksius tertentu yang terkait dengan AIHA, seperti Virus Epstein Barr, dapat secara langsung menginfeksi dan mengacaukan sel imun (Vickers and Baker, 2020)

2.1.3.4 Obat-obatan

Anemia hemolitik yang dimediasi oleh imun adalah efek samping yang jarang dari banyak obat, termasuk penisilin, tetapi pada dalam kebanyakan kasus, antibodi tidak sepenuhnya autoreaktif dan hanya mengikat sel darah merah dengan adanya obat (Garratty, 2010; Garraty dan Arndt, 2014). Namun, contoh lain seperti α -metildopa dapat menyebabkan autoantibodi sel darah merah yang sebenarnya yang dapat menyebabkan AIHA, dengan mengganggu regulasi imun atau struktur antigenik RBC (Vickers and Baker, 2020)

2.1.3.5 Neoplasia

Sebanyak 22% kasus AIHA terjadi bersamaan dengan beberapa bentuk penyakit neoplastik. Banyak pasien dengan CAS memiliki autoantibodi RBC monoklonal yang terkait dengan limfoproliferatif klonal gangguan, paling sering diklasifikasikan sebagai limfoma limfoplasmacytic (Berentsen and Tjønnfjord, 2012).



AIHA tipe hangat dan trombositopenia autoimun keduanya terkait erat dengan CLL.

Lebih dari 10% kasus AIHA juga didiagnosis dengan kondisi tersebut dan leukosit yang bersirkulasi dengan fenotipe mirip CLL yang abnormal dapat dideteksi lebih lanjut pada 19% pasien yang diklasifikasikan dengan gejala primer. Sebaliknya, hingga 14% pasien CLL memiliki AIHA atau peningkatan titer *RBC bound autoantibody*. Salah satu model untuk menjelaskan asosiasi ini adalah banyaknya jumlah sel CLL ganas yang ada di limpa mendorong respons autoimun ke sel yang bersirkulasi dengan bertindak sebagai menyimpang APC (Vickers and Barker, 2020)

2.1.4 Klasifikasi

Pada umumnya pembagian AIHA didasarkan pada suhu reaksi antara antibodi dengan antigen eritrosit, tapi ada juga yang membagi AIHA berdasarkan AIHA sekunder dan primer. Autoantibodi yang bereaksi kuat dengan eritrosit pada suhu 37°C atau dinamakan antibodi tipe hangat (*warm autoantibody*) dan afinitasnya akan berkurang pada suhu rendah atau di bawah 37°C, sedangkan autoantibodi yang berikatan kuat pada suhu 0-4°C dinamakan autoantibodi tipe dingin (*cold autoantibody*) dan afinitasnya akan berkurang pada suhu ruangan (Jäger and Lechner, 2013). Antibodi tipe dingin biasanya berupa imunoglobulin (Ig)-M, komplemen, yang menyebabkan kerusakan sel darah merah intravaskular atau klirens yang dimediasi oleh liver. Sebaliknya, antibodi tipe hangat biasanya IgG, terutama menyebabkan kerusakan sel darah merah dengan klirens sel yang dimediasi limpa.

Pasien yang mengekspresikan antibodi aktif dingin dan hangat (campuran) sangat



bermasalah secara klinis karena dampak ganda dari kerusakan sel darah merah yang parah dan sering menghadirkan tantangan diagnostik dan terapeutik. Anemia hemolitik imun yang diinduksi obat (*Drug-induced immune Hemolytic Anemia* (DI-IHA)) disebabkan oleh antibodi tipe hangat yang mungkin secara klinis dan serologis tidak dapat dibedakan dari tipe autoimun hangat idiopatik (tipe α -metil dopa), spektrum klinis dari perlekatan antibodi yang diinduksi obat ke sel darah merah berkisar dari tanpa gejala hingga hemolisis masif yang mengancam jiwa, dan yang terakhir adalah jenis anemia hemolitik yang dimediasi kekebalan yang berbeda dapat terjadi sebagai komplikasi transplantasi organ. Karena antibodi dihasilkan dari limfosit yang diturunkan dari donor, kelainan ini tidak benar-benar berasal dari "auto"-imun, tetapi dapat dianggap sebagai gangguan graft-versus-host (Friedberg, 2019). Secara garis besar klasifikasi AIHA seperti terlihat pada Tabel 2.2



Tabel 2.2 Klasifikasi anemia hemolitik autoimun (Friedberg, 2019).

Cold-active antibodies
Cold agglutinin disease
Primary or idiopathic Secondary
Lymphoproliferative diseases
Autoimmune disorders
Infections
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>
Infectious mononucleosis
Other viruses
Paroxysmal cold hemoglobinuria
Syphilis
Measles, mumps, other viruses
Mixed cold- and warm-active antibodies
Warm-active antibodies
Idiopathic autoimmune hemolytic anemia
Secondary autoimmune hemolytic anemia
Lymphoproliferative disorders
Autoimmune and immunodeficiency disorders
Malignancy
Viral infections
Drug-induced immune hemolytic anemia
Drug adsorption type (penicillin)
Neoantigen type (quinidine/stibophen)
Autoimmune type (α-methyl dopa)
Nonimmune type (first-generation cephalosporins)
Transplant-associated hemolytic anemia
Hematopoietic stem cell transplant
Minor ABO group mismatch
Major ABO group mismatch
Passive antibody transfer
Solid organ transplant
Passenger lymphocyte syndrome
Passive antibody transfer

2.1.4.1 AIHA Tipe Hangat (Warm AIHA)

AIHA tipe hangat menunjukkan spektrum karakteristik klinis yang sangat luas dalam hal usia saat onset, derajat manifestasi klinis, dan terjadinya terkait atau tidak terkait dengan gangguan. Kondisi utama terkait dengan sekunder AIHA tercantum dalam

Tabel 2.3. Pada wanita, bahkan mungkin ada wAIHA sekunder terkait dengan kista



ovarium. Infeksi, terutama virus telah dikaitkan dengan pengembangan wAIHA seperti halnya transfusi sebelumnya dan transplantasi (Jager, et al., 2020)

Table 2.3 Gangguan atau kondisi utama yang berhubungan dengan wAIHA sekunder pada orang dewasa

Hematologic disorders and lymphoproliferative diseases:

Chronic lymphoid leukemia

T-LGL leukemia

B-cell lymphoma/ Hodgkin lymphoma

Angioimmunoblastic T cell-lymphoma

Castleman disease

Myelodysplastic syndromes/Myelofibrosis

Other immune cytopenias e.g., Evans syndrome

Solid tumors: Thymoma /Ovarian dermoid cyst/Carcinoma

Auto-immune and inflammatory diseases:

Systemic lupus erythematosus /Antiphospholipid syndrome

Rheumatoid arthritis, Sjögren syndrome

Pernicious anaemia/Thyroiditis

Myasthenia gravis

Auto-immune hepatitis, primary biliary cirrhosis

Ulcerative colitis

Sarcoidosis

Eosinophilic fasciitis

Infections:

Virus: HIV/Ebstein Barr virus/hepatitis C/cytomegalovirus

Bacteria: tuberculosis / brucellosis/babesiosis

Drugs: antibiotics (ceftriaxone, piperacillin); NSAIDs (diclofenac); antineoplastic drugs (oxaliplatin), check-point inhibitors (nivolumab).

Primary immunodeficiencies

Common variable immunodeficiency

Hyper IgM syndrome/ALPSb

Others :

Post-allogenic bone marrow transplantation, post-liver or small bowel transplant

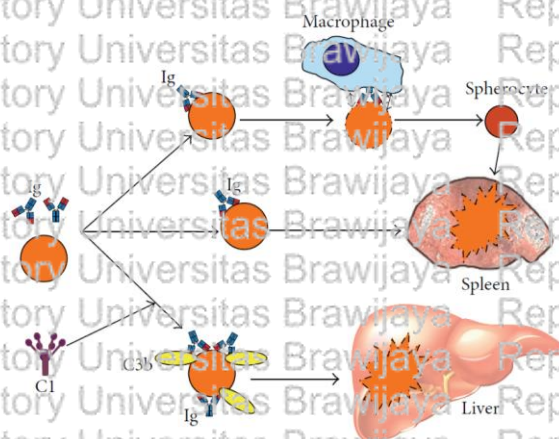
Rosai-Dorfman disease

Warm autoimmune hemolytic anemia (wAIHA) dapat diklasifikasikan lagi menjadi idiopatik dan sekunder. Pada pasien dengan wAIHA idiopatik, penyebabnya masih tidak diketahui. Penyakit yang lain yang sering menyertai wAIHA adalah seperti



penyakit limfoproliferatif (*chronic lymphocytic leukemia*, *B-lymphocytic lymphomas*, dan *Waldenstrom macroglobulinemia*), neoplasma non limfoid (*thymoma* dan kanker kolon, ginjal, paru dan ovarium), penyakit autoimun (*rheumatoid arthritis*, *scleroderma*, *polyarteritis nodosa*, *Sjogren syndrome*, dan *SLE*) dan penyakit imunodefisiensi dan infeksi virus. (Zeerleder, 2011; Friedberg and Johari, 2014; Michel and Jäger, 2018).

Onset terjadinya WAIHA biasanya bertahap, dengan gejala anemia (lemah, letih, pusing, sesak napas), tetapi beberapa kasus dapat terjadi akut dan mengancam nyawa dengan gejala demam, ikterik, splenomegali, dan hepatomegali. Anemia pada WAIHA bisa ringan maupun berat, dengan umur eritrosit berkurang hingga 5 hari atau kurang. Pemeriksaan laboratorium untuk serum dan urin memberikan gambaran hemolitik ekstravaskuler yang terjadi karena *IgG-mediated immune hemolysis*, seperti pada Gambar 2.3



Gambar 2.3 Mekanisme destruksi eritrosit pada waiha.

Ig: imunoglobulin; C: protein komplemen (Berentsen and Sundic, 2015)



2.1.4.1.1 AIHA terkait obat

Lebih dari 150 obat telah dikaitkan dengan perkembangan AIHA tipe hangat. AIHA tipe hangat terkait obat telah dibagi menjadi 2 kategori berdasarkan mekanisme (Tabel 2.4). Yang pertama karena ketergantungan obat antibodi yang mengaktifkan respons imun hanya saat obat hadir. Ini adalah jenis AIHA terkait obat yang paling umum.

Ada dua subtype antibodi yang bergantung pada obat yaitu hapten-mediated antibodi, yang bereaksi terhadap epitop campuran yang terdiri dari sel darah merah struktur, dan obat yang terikat secara non-kovalen ke RBC. Pengikatan antibodi ini mungkin sangat kuat seperti yang biasa terlihat pada penisilin yang menginduksi AIHA (tipe penisilin) ditandai dengan DAT untuk IgG positif dan negatif untuk komplemen.

Sebaliknya, obat pengikat pada RBC mungkin juga agak lemah (misal ceftriaxone) menghasilkan formasi kompleks imun (tipe kompleks imun), yang ditandai muncul pada onset yang terlambat atau lemah setelah dimulainya obat dan DAT positif untuk komplemen dan negatif untuk IgG. Mekanisme kedua adalah karena antibodi yang tidak tergantung obat, yang mampu menciptakan autoimun respon dengan tidak adanya obat yang menyinggung. Berbagai mekanisme telah disarankan oleh obat mana (yaitu, fludarabine, cladribine, metildopa) merangsang pembentukan autoantibodi melalui adsorpsi, disregulasi kekebalan, atau mekanisme lain tetapi tidak ada yang memiliki telah dijelaskan sepenuhnya (Jager, et al., 2020)



Tabel 2.4 Obat-obat yang menginduksi pembentukan antibodi

Hapten and drug adsorption mechanisms	Drugs such as penicillins, cephalosporins, tetracycline, carbromal, hydrocortisone, oxaliplatin, and tolbutamide
Immune/ternary complex mechanisms	Drugs such as stibophen, metformin, quinine, quinidine, cephalosporins, amphotericin b, rifampicin, antazolinic, thiopental, tolmetin, probenecid, nomifensine, cephalosporins, diclofenac and doxepin
Autoantibody mechanism	Drugs such as cephalosporins, tolmetin, α -methyldopa, L-dopa, mefenamic acid, teniposide, pentostatin, cladribine, fludarabine, lenalidomide, procainamide and diclofenac
Non-immunologic protein adsorption	Cephalosporins, carboplatin, cisplatin and oxaliplatin
Unknown methods of AIHA causation	Drugs such as mesantoin, phenacetin, insecticides, chlorpromazine, acetaminophen, ibuprofen, thiazides, omeprazole, carboplatin, nalidixic acid, erythromycin, and streptomycin

2.1.4.1.2 Sindrom Evans

AIHA tipe hangat mempresentasikan baik secara bersamaan atau berurutan dengan trombositopenia dikenal sebagai sindrom Evans. Diagnosis ini, terutama pada dewasa muda dan pasien anak, harus didampingi dengan pemeriksaan imunologi dasar termasuk skrining imunodefisiensi variabel umum dan limfoproliferatif autoimun sindrom (ALPS) (Jager *et al.*, 2020)

2.1.4.2 Cold Agglutinin Disease (CAD) / AIHA tipe dingin

Cold Agglutinin Disease (CAD) dimediasi oleh CA (*cold agglutinin*) yang merupakan autoantibodi IgM yang mampu untuk menggumpalkan sel darah merah setelah mengikat antigen permukaan. CAD primer ditentukan oleh hemolisis kronis, titer CA yang signifikan (paling sering didefinisikan sebagai > 64) pada 4°C , temuan



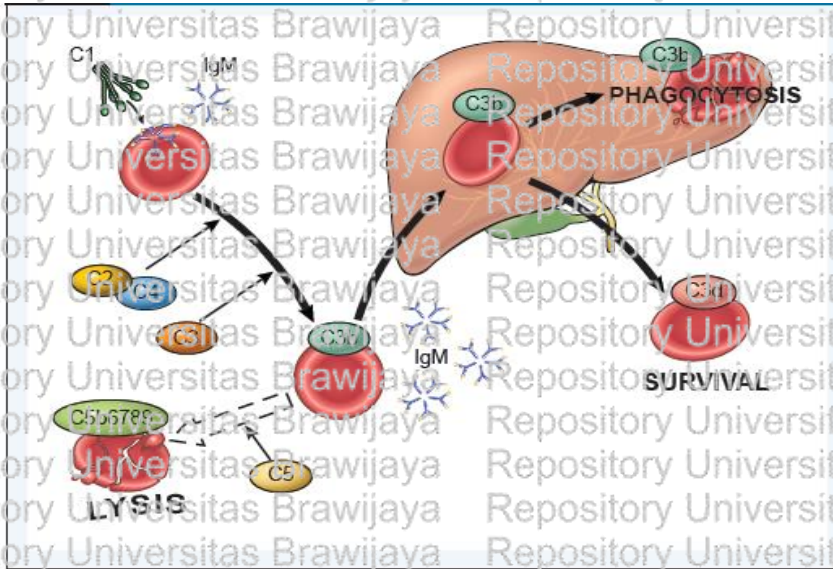
tipikal oleh DAT, dan tidak adanya penyakit klinis yang mendasari. Pola DAT khas yaitu tes monospesifik positif hanya untuk C3d. Namun, DAT bisa menjadi positif lemah untuk IgG selain C3d di atas menjadi 20% dari pasien. Suatu studi merekomendasikan pemberian titer sebagai angka, didefinisikan sebagai nilai kebalikan dari pengenceran tertinggi pada aglutinasi mana yang terjadi. Studi juga menyadari bahwa mungkin ada sesekali kasus CAD dengan CA titer < 64. Penentuan amplitudo termal memakan waktu dan, dalam banyak kasus, tidak diperlukan untuk dapat diandalkan diagnosis, tetapi mungkin berguna pada pasien tertentu untuk menyingkirkan secara normal terjadi CA titer rendah sebagai penyebab temuan positif palsu. Kriteria laboratorium yang sama berlaku untuk sindrom aglutinin dingin sekunder (CAS) yang mempersulit limfoma agresif atau infeksi spesifik. Penilaian klinis dan histologis, dilengkapi dengan pemeriksaan radiologi sesuai kebutuhan, akan menyingkirkan kasus CAS sekunder untuk penyakit ganas. IgMk monoklonal serum dapat ditemukan oleh kapiler atau agarose elektroforesis dan imunofiksasi di lebih dari 90% pasien, sedangkan IgG, IgA, atau λ fenotipe rantai ringan adalah temuan langka. Klonal CD20 +, κ + limfosit biasanya dapat dideteksi oleh aliran sitometri aspirasi sumsum tulang. Frekuensi temuan positif tergantung pada berapa lama yang telah dilakukan untuk mengidentifikasi klon kecil dari sel B.

Cold Agglutinin Disease (CAD) primer telah terbukti menunjukkan pola histopatologi tertentu dari sumsum tulang, disebut "limfoproliferatif terkait gangguan primer CA (LPD)" dan ditemukan berbeda dari limfoplasmacytic limfoma (LPL), limfoma zona marginal (MZL) dan entitas limfoma lainnya yang sebelumnya dikenal.

Temuan khas memiliki digambarkan sebagai agregat sel B nodular (atau, pada



beberapa pasien, hanya sel B tersebar) tanpa ciri khas LPL, seperti paratrabekuler perumbuhan, fibrosis, morfologi sel limfoplasmacytoid, atau peningkatan jumlah sel mast yang mengelilingi agregat limfoid. Perbedaan antara CAD dan LPL juga telah dibuktikan dengan metode imunohistokimia dan flow sitometrik. Mutasi MYD88 L265P, terdapat di hampir semua kasus LPL, adalah tidak ada atau jarang di LPD terkait CA. Kadang-kadang pasien yang telah menjalani histologi sumsum tulang diartikan sebagai LPD tingkat rendah lainnya, seperti LPL, MZL, limfositik kecil limfoma, atau limfoproliferasi sel B yang tidak diklasifikasikan, harus juga diklasifikasikan memiliki CAD primer. CA mengikat antigen RBC pada suhu rendah, diikuti dengan aglutinasi sel darah merah. Gejala sirkuler akibat aglutinasi RBC terjadi pada mayoritas dan dapat menjadi masalah bagi pasien bahkan tanpa anemia. Antibodi memisahkan diri dari sel pada suhu tubuh pusat. Setelah jalur komplemen klasik teraktivasi, eritrosit berlapis C3b dihilangkan oleh makrofag dari sistem fagositik mononuklear (hemolisis ekstravaskular). Untuk tingkat yang berbeda, aktivasi komplemen terakhir juga dapat menghasilkan pembentukan serangan membran kompleks dan hemolisis intravascular (Jager, et al., 2020) Proses terjadinya hemolisis melalui sensitisasi IGM dan aktivasi komplemen seperti terlihat pada Gambar 2.4.



Gambar 2.4 Penghancuran eritrosit pada *cold agglutinin disease*. Proses hemolisis intravaskular dan ekstrasvaskular yang disebabkan oleh IgM dan aktivasi komplemen. Darah yang terpapar dengan suhu yang dingin selama melewati pembuluh darah perifer akan menyebabkan *cold agglutinin* IgM berikatan dengan eritrosit dan menyebabkan aglutinasi dan fiksasi komplemen C1. C1 esterase mengaktifkan C4 dan C2 menghasilkan C3 konvertase yang berikatan dan memecah C3, menyebabkan deposit C3b pada permukaan eritrosit. Setelah masuk ke sentral sirkulasi dan suhu tubuh kembali hangat, IgM akan terlepas dari eritrosit dan masuk ke dalam serum dan eritrosit yang mengalami aglutinasi akan terlepas satu sama lainnya. C3b tetap berikatan dan akan mengaktifkan C5 yang kemudian membentuk kompleks pada permukaan eritrosit dan hemolisis, yang nampaknya memegang peranan penting selama eksaserbasi akut. Dalam kondisi ini eritrosit yang disensitisasi oleh C3b akan difagosit oleh sel-sel retikuloendothelial dalam hepar dan menyebabkan hemolisis ekstrasvaskuler. Dalam hepar C3b convertase akan menyebabkan deposit C3d pada eritrosit yang masih hidup dan dibebaskan ke sirkulasi (Berentsen, 2009).

2.1.4.3 Mixed AIHA

Mixed AIHA ditandai dengan DAT positif untuk IgG dan C3, dengan koeksistensi agglutinin dingin titer tinggi (> 40). Pasien seperti itu memiliki keduanya,

AIHA tipe hangat dan tipe dingin dan harus diklasifikasikan secara terpisah dari pasien

AIHA tipe hangat memiliki DAT positif untuk IgG dan C3. Bentuk campuran mewakili sekitar 8-10% dari semua AIHA dan umumnya ditandai dengan onset yang berat,



sekitar 2/3 dengan Hb <6 g / dL dan ¼ dengan Hb 6–8 g / dL. Dalam sebuah penelitian besar terhadap 308 pasien AIHA, pasien AIHA campuran memiliki median penurunan hemoglobin yang signifikan saat onset (median 5,8 g / dL) dibandingkan dengan jenis AIHA lainnya (~ 7 g / dL di wAIHA dan ~ 8 g / dL di CAD) dan lebih banyak retikulositopenia. Selain itu, mixed AIHA lebih sering membutuhkan 2 atau lebih jalur terapi, termasuk kortikosteroid, rituximab, imunosupresan dan / atau splenektomi (Jager, *et al.*, 2019)

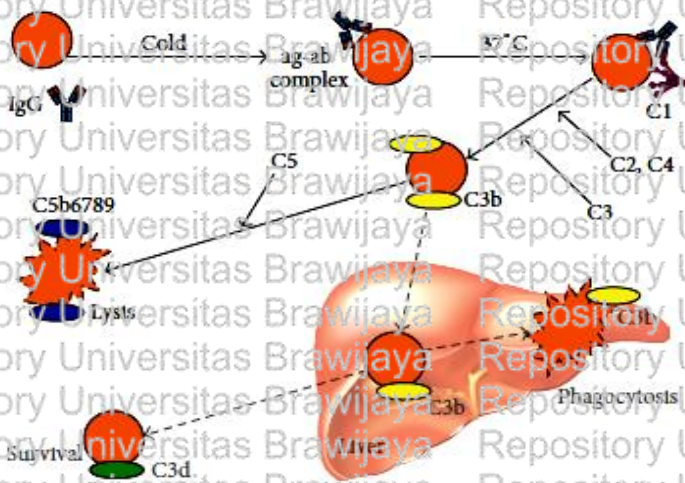
2.1.4.4 Paroximal Cold Hemoglobinuria

Paroximal Cold Hemoglobinuria (PCH) adalah bentuk AIHA yang langka dimediasi oleh autoantibodi IgG yang bergantung pada suhu dengan spesifisitas melawan antigen P pada sel darah merah, pertama kali dijelaskan oleh Donath dan Landsteiner. Autoantibodi mengikat sel darah merah pasien dalam cuaca dingin. Ketika suhu naik menuju 37°C, antibodi terlepas dari sel darah merah tetapi komplemen awalnya terikat sekarang diaktifkan dan menyebabkan hemolisis. Antibodi bifasik ini pertama kali dijelaskan dalam hubungannya dengan sifilis pada orang dewasa. Saat ini, PCH terjadi terutama pada anak-anak dengan riwayat infeksi virus ("mirip flu") baru-baru ini. Ini menyajikan dengan hemolisis intravaskular, yang dapat terjadi bahkan tanpa adanya paparan dingin yang dapat diidentifikasi.

Dalam pemeriksaan diagnostik, DAT positif (hanya untuk C3), skrining antibodi negative bersama dengan gejala khas jika tidak ada wAIHA, CAD, DIHA atau PNH menunjukkan PCH. Inspeksi visual dari sampel darah yang disentrifugasi untuk hemolisis intravaskular dapat membantu, meskipun hemolisis *in vitro* karena



pengambilan sampel darah yang buruk harus dianggap sebagai penyebab hasil positif palsu. Diagnosis pasti adalah masih berdasarkan tes biphasic in vitro Donath-Landsteiner (DL). Serum pasien diinkubasi dengan sel darah merah (RBC) normal didinginkan selama 30 menit, dilanjutkan dengan pemanasan hingga 37°C. Hemolisis pada tes "biphasic" menunjukkan diagnosis PCH. Tergantung pengujian yang mana metode yang digunakan, tes ini bisa memakan waktu, intensif sumber daya, mahal, dan rentan terhadap hasil negatif palsu. Baru-baru ini survei laboratorium di Kanada, 17 tes positif (terutama di anak-anak) dilaporkan dalam 124 pengujian, menunjukkan bahwa penyakit tersebut sangat jarang atau tes tidak sering diminta mengingat perkiraan frekuensi PCH 1-3 dalam 100.000. Masih ada kesepakatan yang buruk di antara para ahli tentang interpretasi tes DL positif pada orang dewasa, menyarankan bahwa tes ini paling baik dilakukan di laboratorium rujukan (Jager, *et al.*, 2020)



Gambar 2.5 Destruksi eritrosit imun, diperantarai-komplemen pada *paroxysmal cold hemoglobinuria* (PCH) menunjukkan optimum suhu *biphasic*. Panah hitam: jalur utama (hemolisis intravaskuler); panah abu-abu/titik-titik: mungkin jalur minor; Ig: *immunoglobulin*; ag: antigen; ab: *antibody*; C: *complement protein* (Berentsen and Sundic, 2015).



2.1.4.5 AIHA atipikal

DAT negatif, IgA-driven, dan warm-IgM AIHA umumnya didefinisikan sebagai bentuk atipikal. Kasus-kasus ini merupakan tantangan diagnostik, biasanya mengakibatkan keterlambatan pengobatan. Apalagi terapi lini pertama steroid biasanya diberikan tanpa memperhatikan kebutuhan penanganan lebih lanjut mungkin menghasilkan ketidakpastian dan kesulitan. Ini khususnya merepotkan karena kasus atipikal sering menunjukkan onset yang parah dan dikaitkan dengan peningkatan risiko kambuh (Jager, *et al.*, 2020)

2.1.5 Diagnostik Klinis

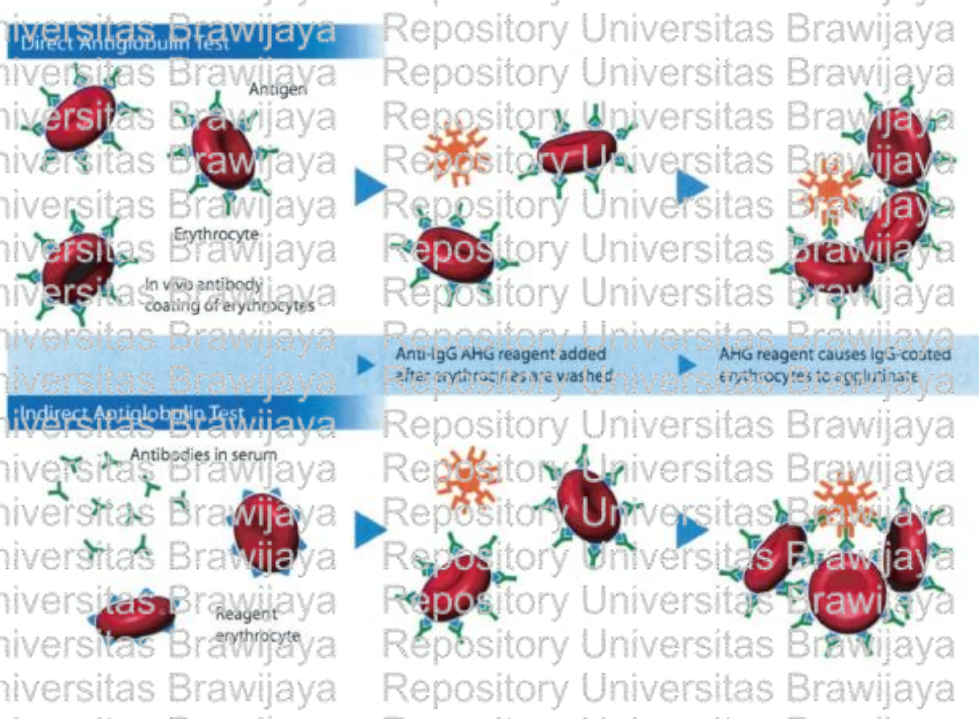
Dalam CAS dan AIHA tipe hangat (Packman, 2008), gambaran klinis yang dominan mencerminkan anemia, yang paling sering menyebabkan kelelahan dan dispnea. Tanda-dan gejalanya meliputi pucat dan ikterus, dan hemolisis masif dapat memicu hemoglobinuria. Di CAS mungkin juga ada sianosis atau bahkan nekrosis pada ekstremitas tubuh. Pada AIHA tipe hangat, splenomegali atau hepatomegali dapat dikaitkan dengan hemolisis ekstravaskuler (Packman, 2015). Jika AIHA bersifat sekunder, tanda-tanda penyakit yang mendasari dapat mendominasi (Vickers *et al*, 2014)

Dua kriteria harus dipenuhi untuk mendiagnosis AIHA: bukti klinis atau laboratorium hemolisis dan bukti serologis autoantibodi. Tes dasar untuk mengevaluasi hemolisis adalah termasuk hitung darah lengkap (CBC) dengan apusan darah perifer, bilirubin, laktat dehidrogenase (LDH, terutama isoenzim 1), haptoglobin, dan hemoglobin urine atau hemosiderin. Tanda-tanda umum hemolisis meliputi



penurunan hemoglobin dan hematokrit, peningkatan LDH serum dan bilirubin *unconjugated*, serta polikromasia dan retikulositosis yang menandakan cadangan hematopoietik yang memadai. Haptoglobin biasanya berkurang, meskipun tingkat sekuensial harus dinilai karena protein tersebut adalah reaktan fase akut dan dengan demikian bergantung pada fungsi hati dan tekanan vaskular sistemik. Hemolisis intravaskular selanjutnya bermanifestasi dengan peningkatan hemoglobinemia bebas, peningkatan hemoglobinuria, hemosiderinuria, methemalbuminemia, dan penurunan haptoglobin serum. Hemoglobinemia biasanya terlihat dalam tabung pengumpulan spesimen sebagai serum atau plasma yang jernih berwarna merah atau merah jambu. Hemolisis di AIHA dapat bersifat intravaskular atau ekstrasvaskular. Biasanya, hemolisis intravaskular berlangsung cepat dan agresif, sedangkan hemolisis ekstrasvaskular lebih ringan. Apusan darah tepi dapat menunjukkan sferosit dalam AIHA hangat atau aglutinasi RBC pada AIHA dingin (Friedberg, 2019).

Adanya imunoglobulin yang terikat pada permukaan sel darah merah atau bukti fiksasi komplemen mendukung diagnosis kerusakan sel darah merah yang dimediasi imun. Sel darah merah berlapis IgM dapat secara spontan menggumpal karena antibodi pentamerik dapat langsung reaksi silang dengan sel darah merah. Kemampuan antibodi IgM untuk menggumpalkan sel darah merah yang tersuspensi saline tanpa reagen tambahan mengarah pada terminologi tradisional antibodi "komplit". Sebaliknya, antibodi IgG biasanya membutuhkan *antihuman globulin* (AHG) sebagai kofaktor untuk menggumpalkan sel darah merah yang tersuspensi saline dan dengan demikian disebut antibodi "tidak lengkap" (Friedberg, 2019).



Gambar 2.6 Direct Antiglobulin Test (DAT) dan Indirect Antiglobulin Test (IAT) (Friedberg, 2019)

Terdapatnya autoantibodi tidak selalu patogenik. Sekitar 1 dalam 10.000 donor darah sehat hasil tes autoantibodinya positif, yang frekuensinya semakin meningkat dengan bertambahnya usia. Pengikatan autoantibodi pada permukaan eritrosit dapat dideteksi secara laboratorium dengan pemeriksaan *direct antiglobulin test* (DAT). Sedangkan autoantibodi yang bebas di serum/plasma dapat dideteksi dengan *indirect antiglobulin test* (IAT) (Blann and Ahmed, 2014). DAT mencerminkan sensitisasi antibodi in vivo pada sel darah merah. Eritrosit dicuci untuk menghilangkan antibodi yang tidak terikat, dan reagen anti-IgG antihuman globulin (AHG) kemudian ditambahkan. Antibodi IgG tidak dapat menyebabkan aglutinasi sel darah merah langsung, tetapi sel darah merah berlapis IgG akan menggumpal dengan adanya anti-



IgG yang mengandung AHG. Tes ini juga dapat dilakukan dengan menggunakan reagen anticomplement AHG. Jika ada, IgG terikat RBC dapat dilusi untuk penentuan spesifisitas. *Indirect Antiglobulin Test* (IAT) digunakan untuk mendeteksi keberadaan antibodi IgG dalam serum (sensitisasi *in vitro*). Reagen RBC diinkubasi dengan adanya serum yang mungkin mengandung antibodi. Jika ada, antibodi mengikat antigen targetnya pada reagen sel darah merah. Setelah inkubasi, sel darah merah dicuci untuk menghilangkan antibodi yang tidak terikat. Reagen Anti-IgG AHG ditambahkan dan akan menyebabkan eritrosit yang dilapisi IgG menggumpal (Friedberg, 2019).

Adanya autoantibodi terhadap eritrosit juga tidak selalu menyebabkan hemolisis dan anemia. Sebagian besar pasien dengan konsentrasi autoantibodi yang rendah mempunyai *direct agglutination test* (DAT, *direct Coombs' test*) positif tapi tidak mengalami anemia dan gejala-gejala lainnya. DAT yang positif dapat disertai hemolisis oleh karena proses imun dan hemolisis oleh karena penyebab lain atau penyebab non imun, sedangkan DAT negatif bisa juga disertai hemolisis (Parjono dan Widayati, 2009). Sejumlah kecil pasien dengan DAT positif tanpa disertai pemendekan umur eritrosit atau tanpa disertai bukti-bukti hemolisis ditemukan pada 1%-15% pasien yang dirawat di rumah sakit. Hal ini mungkin disebabkan proses peradangan yang menyebabkan adsorpsi antibodi non spesifik pada permukaan membran eritrosit. Antibodi ini tidak berikatan secara imunologik dengan antigen spesifik eritrosit sehingga tidak menyebabkan hemolisis. Ketika derajat hemolisisnya signifikan maka anemia, ikterik, dan splenomegali dapat terjadi.



2.1.6 Patofisiologi

2.1.6.1 Mekanisme Patogenik Penghancuran Sel Darah Merah

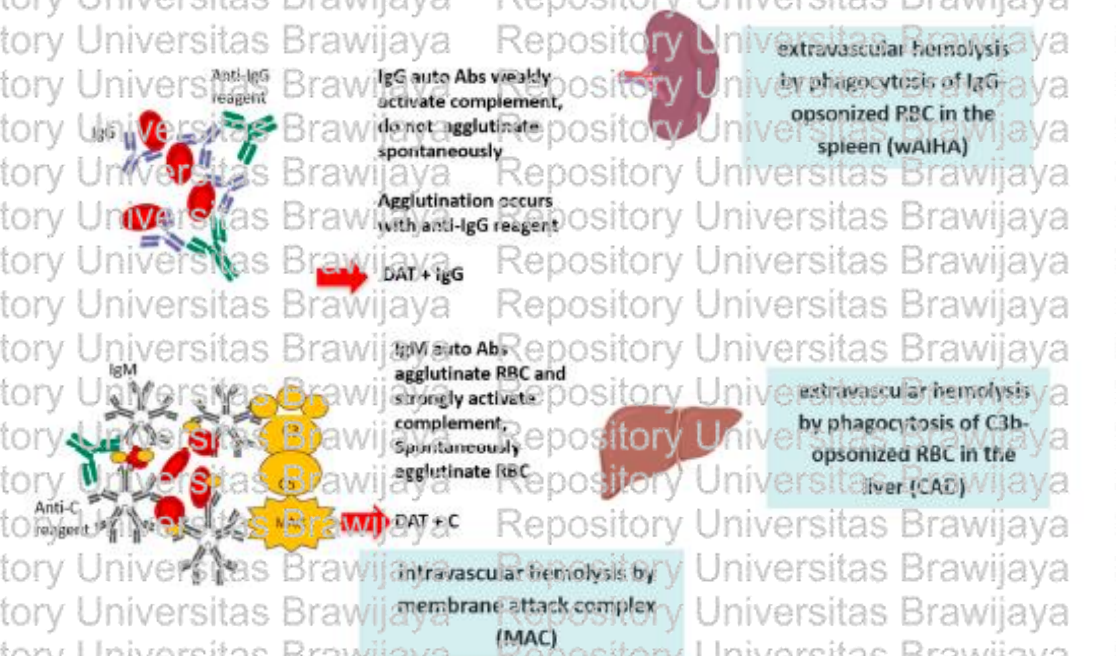
Definisi tipe dan karakteristik termal dari autoantibodi adalah hal penting yang mendasar karena menentukan mekanisme hemolisis yang berbeda, dengan konsekuensi yang berbeda gambaran klinis dan pendekatan terapeutik. Autoantibodi IgG adalah monomer yang mengikat secara lemah sistem komplemen, mereka menyebabkan kerusakan sel darah merah melalui *antibody dependent cellulae cytotoxicity* (ADCC) digerakkan oleh sel-sel sistem monosit-makrofag yang memfagosit sel darah merah melalui Fc fragmen IgG (atau iraksi komplemen C3b).

Limfosit teraktivasi yang mengekspresikan reseptor fragmen IgG Fc dan untuk C3b juga dapat memediasi ADCC. Oleh karena itu, hemolisis bersifat ekstravaskular dan sebagian besar terjadi di limpa pada kasus ADCC yang dimediasi makrofag, dan di hati pada kasus ADCC yang dimediasi C3b. Khususnya, limpa mewakili organ hemokateretik yang menghilangkan semuanya sel-sel darah yang rusak / tua, tetapi juga merupakan organ limfatik, dan karena itu dapat berkontribusi untuk produksi autoantibodi. Berbeda dengan IgG, autoantibodi IgM adalah pentamers, dengan aviditas dan kemampuan yang tinggi untuk mengaktifkan kaskade komplemen sampai kompleks litik akhir (C5 - C9). Yang terakhir menentukan lisis sel darah merah langsung di sirkulasi (hemolisis intravaskular) melalui aktivasi dari "perforin" dan faktor sitotoksik lainnya. Telah dihitung penyebab hemolisis ekstravaskuler penghancuran sekitar 0,25 mL sel darah merah per kg berat badan per jam (kurang lebih 420 mL sel darah merah dalam 24 jam untuk pasien dengan BB 70 kg), varians, penyebab



hemolisis intravaskular yang dimediasi IgM penghancuran sekitar 200 ml sel darah merah per jam, dengan konsekuensi keparahan klinis yang lebih besar (Gambar 2.7)

Terakhir, pemain penting dalam menentukan patogenesis dan tingkat keparahan klinis AIHA adalah hematopoietik sumsum tulang, yang mengkompensasi anemia dengan meningkatkan eritropoiesis. Penanda dari fenomena ini adalah peningkatan jumlah retikulosit (sel darah merah yang belum matang dengan residu inti) dalam darah tepi. Retikulositosis sebenarnya adalah tanda yang "baik" dalam perjalanan AIHA, yang mengindikasikan kompensasi sumsum tulang yang efisien. Sebaliknya, pada kasus anemia berat dengan retikulositopenia, prognosnya buruk, dengan keparahan klinis yang lebih besar dan respons yang lebih lambat terhadap terapi. Dalam beberapa kasus, retikulositopenia mungkin karena autoimunitas terhadap prekursor sumsum tulang (Barcellini, et al. 2020)



Gambar 2.7 Mekanisme patogenesis destruksi sel darah merah (Barcellini, et al., 2020)



2.1.6.2 Latar Belakang Genetik dalam Patogenesis AIHA

Latar belakang genetik memainkan peran penting. AIHA telah dikaitkan dengan HLA-B8 dan lokus BW6, dengan konfigurasi tertentu dari daerah variabel imunologi rantai berat dan ringan (IGHV dan IGKV), dan dengan polimorfisme antigen gen limfosit T sitotoksik-4 (CTLA-4) (Barcellini, *et al.* 2020). Baru-baru ini, mutasi gen KMT2D dan CARD11 telah dilaporkan pada 69% dan 31% pasien CAD. Selain itu, mutasi pada gen yang terlibat dalam imunodefisiensi primer (TNFRSF6, CTLA4, STAT3, PIK3CD, CBL, ADAR1, LRBA, RAG1, dan KRAS) telah dilaporkan di sekitar 40% dari sindrom Evans pediatrik (hubungan AIHA dan trombositopenia primer) (Hadjaaj *et al.*, 2020). Hubungan erat antara autoimunitas dan imunodefisiensi disorot oleh dua imunodefisiensi ditandai dengan peningkatan fenomena autoimun: sindrom limfoproliferatif autoimun (ALPS) dan sindrom Kabuki (KS); yang pertama ditandai oleh organomegali dan dengan adanya mutasi somatik atau germline dari gen yang terlibat dalam apoptosis (yaitu, FAS, FASL, CASP10, CASP 8, NRAS, atau KRAS); KS ditandai dengan malformasi dan cacat intelektual, dan disebabkan oleh mutasi pada gen KDM6A atau KMT2D, yang terlibat dalam toleransi dan pematangan sistem imun (Margot *et al.*, 2020 dan Almecija *et al.*, 2019)

2.1.6.3 Mekanisme Imunologi Patogenesis AIHA

Autoimunitas dapat muncul dari beberapa mekanisme, seperti yang dirangkum pada Gambar 2.8. Salah satunya yang paling sederhana adalah modifikasi antigen RBC sebagai konsekuensi dari agen atau obat infeksius. Selama infeksi, ada yang disebut "mimikri molekuler", (yaitu, reaksi silang antara antigen determinan agen

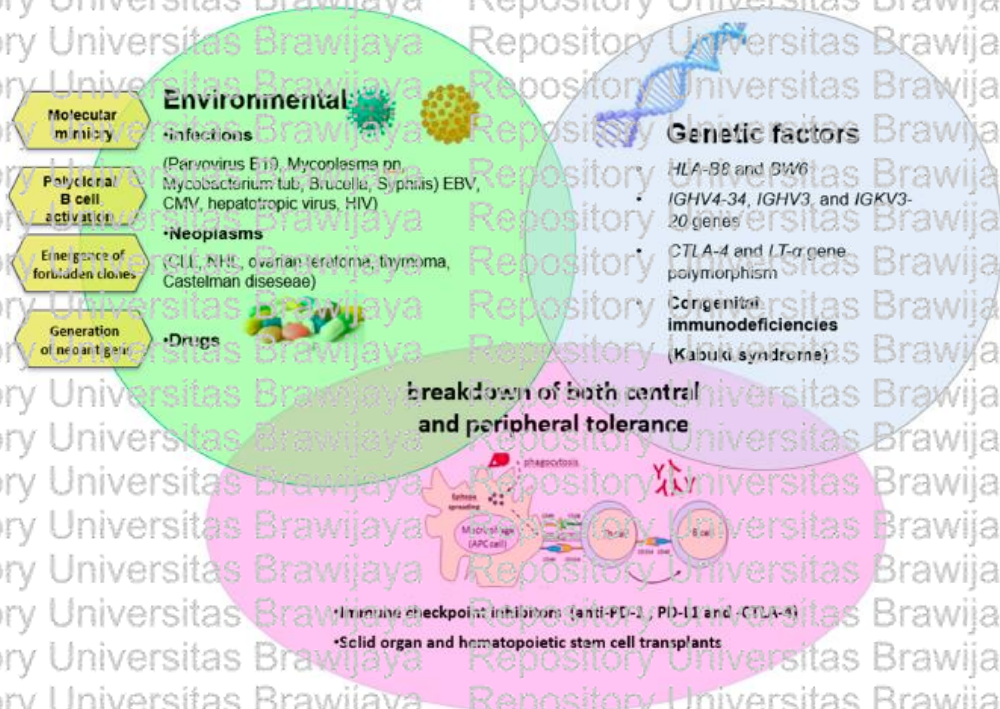


infeksius dan molekul diri). Beberapa infeksi telah dikaitkan dengan AIHA (parvovirus B19, virus hepatotropik, HIV, mycoplasma pneumonia, mycobacterium tuberculosis, brucella, sifilis) termasuk baru-baru ini, pneumonia COVID-19 (Lazarian, *et al.*, 2020; Capes, *et al.*, 2020; Angileri, *et al.*, 2020). Obat dapat menyebabkan produksi autoantibodi dengan memodifikasi membran RBC dengan adsorpsi ke membran atau dengan mengikat membran sebagai imunokompleks. Dalam kasus pertama, AIHA yang diinduksi obat tidak dapat dibedakan dari bentuk primer klasik dengan DAT positif untuk IgG dan hemolisis ekstravaskular (contoh tipikal alpha-methyldopa). Kemudian dalam kasus berikutnya, autoantibodi (umumnya IgG) bereaksi dengan obat tersebut terkait erat dengan membran RBC (contoh tipikal adalah penisilin, ampisilin, metisilin, karbenisilin, dan sefalosporin). Dalam kasus ketiga (imunokompleks obat-antibodi terhadap obat), antibody umumnya IgM, hemolisisnya intravaskular, dan DAT positif untuk komplemen (banyak obat-obatan yang terlibat seperti quinidine, phenacetin, hydrochlorothiazide, rifampicin, sulfonamides, isoniazid, kina, tetrasiklin, hidralazin, kloropromazin, dan streptomisin (Hill, 2017)

Mekanisme tambahan untuk produksi autoantibodi adalah apa yang disebut "munculnya klon terlarang" selama sindrom limfoproliferatif B (seperti leukemia limfositik kronis dan limfoma). Hipotesis ini diajukan oleh Burnet lebih dari 60 tahun yang lalu, dan didasarkan tentang keberadaan klon limfosit yang reaktif sendiri yang seharusnya telah terhapus pada janin, tetapi dapat mengaktifkan kembali dan meningkatkan reaksi autoimun (McQueen, 2012). Wawasan yang lebih baru tentang produksi autoantibodi pada pasien dengan CLL. Sel CLL dapat memfasilitasi presentasi antigen autoimunitas secara langsung, dan melalui produksi sel T regulasi



nonfungsional yang menjadi bahan bakar ketidakseimbangan antara sel Th17 dan T-reg. Beberapa sel neoplastik juga dapat menghasilkan kondisi autoantibodi, bagaimanapun, ini terutama IgG poliklonal yang diproduksi oleh sel B self-reaktif non-ganas. Mirip dengan mekanisme ini adalah aktivasi sel B poliklonal, terjadi dalam kondisi yang berbeda seperti infeksi EBV, CMV, virus hepatotropik, dan HIV. Akhirnya, dasar dari fenomena autoimun adalah karena kerusakan "toleransi diri", yang dikendalikan oleh mekanisme seluler yang kompleks dan sitokin pola belum sepenuhnya dipahami (Abbas dan Lichtman, 2012). Ini adalah kasus imunodefisiensi bawaan, di mana autoimunitas yang timbul dari interaksi kompleks ini juga ditopang oleh mutasi germinal yang merusak toleransi pematangan. Sel T-helper folikel, yang terlibat dalam inisiasi dan pemeliharaan respon imun yang menghasilkan sel B memori dan sel plasma berumur panjang, baru-baru ini terbukti meningkat dalam sitopenia autoimun dan berkontribusi pada produksi autoantibodi (Barcellini, *et al.*, 2015)



Gambar 2.8 Faktor imunologis, lingkungan, dan genetik yang terlibat dalam pathogenesis anemia hemolitik autoimun (AIHA). CLL: leukemia limfositik kronis, NHL: non-Hodgkin limfoma, PD1 / -L: kematian terprogram 1 dan ligannya, CTLA 4: limfosit T sitotoksik. (Barcellini, *et al.*, 2020)

2.1.6.4 Disregulasi Sitokin di AIHA

Ada juga bukti disregulasi sitokin pada AIHA. Di antara banyak dan terkadang temuan yang bertentangan, interleukin (IL)-4, IL-6, dan IL-10 telah ditemukan meningkat pada kontrol yang sehat (Barcellini, *et al.*, 2020). Hal ini konsisten dengan respons humoral T-helper (Th) 2 yang lazim dan mekanisme penghancuran sel darah merah yang dimediasi oleh antibodi pada AIHA. Interferon (IFN)- γ telah dilaporkan berkurang pada pasien AIHA dibandingkan dengan kontrol, mengakibatkan penurunan penghambatan respon Th2, dan akibatnya dalam amplifikasi penyakit autoimun yang dimediasi autoantibodi. Imunitas seluler juga terlibat dengan

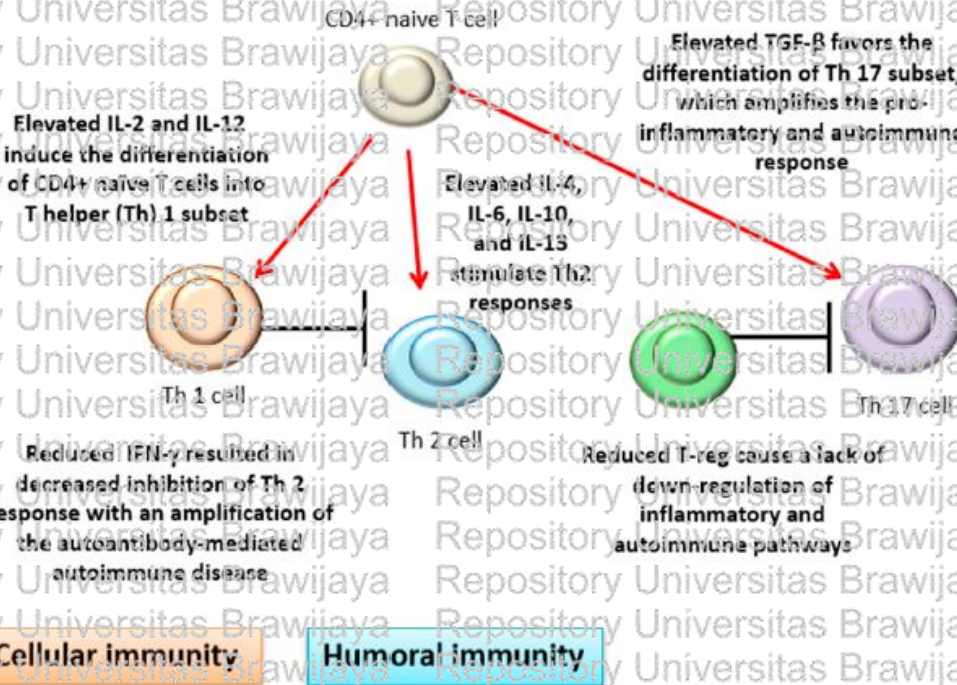


peningkatan aktivitas limfosit T CD8+ sitotoksik, sel NK, dan makrofag yang diaktifkan.

Selain itu, IL-2 dan IL-12, yang menyebabkan diferensiasi Sel T naif CD4+ ke dalam subset Th1, telah ditemukan meningkat, selanjutnya meningkatkan kekebalan seluler.

Sejalan dengan aktivasi berlebih ini, *transformation growth factor* (TGF)- β telah dilaporkan meningkat. Sitokin pleiotropik ini mendukung diferensiasi subset Th17, yang memperkuat respon pro-inflamasi dan autoimun (Xu, *et al.*, 2012). Akhirnya, subset limfosit mampu menurunkan regulasi respon autoimun seperti sel CD4+ T-regulasi perifer telah dilaporkan berkurang pasien AIHA dibandingkan dengan kontrol,

sekali lagi mendukung respon autoimun (Gambar 2.9) (Barcellini, *et al.*, 2020)



Gambar 2.9 Disregulasi sitokin pada AIHA. IL: interleukin, TGF- β transforming growth factor; IFN-: interferon. Panah merah menandakan memicu, garis hitam menghambat/memblok (Barcellini, *et al.*, 2020)



2.1.7 Penatalaksanaan terapi

Perawatan AIHA yang tepat tergantung pada jenis autoantibodi, keparahan klinisnya, kondisi tambahan atau yang mendasari, dan usia pasien. AIHA tipe hangat adalah bentuk yang paling umum dan memiliki perjalanan kambuh yang lama pada anak-anak dan orang dewasa. Dalam keadaan akut dengan presentasi klinis yang parah, transfusi darah harus digunakan sebagai intervensi penyelamatan jiwa, tetapi umumnya tidak direkomendasikan sebagai pilihan pengobatan berkelanjutan. Kortikosteroid adalah terapi lini pertama tradisional untuk pasien dengan AIHA tipe hangat (Niss and Ware, 2018)

2.1.7.1 Tranfusi Darah

Onset AIHA tipe hangat biasanya tiba-tiba dan akut. Meski kebanyakan pasien dewasa membutuhkan manajemen rawat inap pada fase akut, beberapa pasien anak bisa dikelola dalam pengaturan rawat jalan jika gejala dan anemia tidak parah. Keputusan untuk transfusi darah berdasarkan kondisi klinis dan ada tidaknya gangguan kardiovaskular atau komorbiditas medis, bukan konsentrasi hemoglobin saja. Karena autoantibodi hangat di AIHA diarahkan terhadap antigen permukaan sel darah merah dan biasanya bersifat pan-reaktif, cross-match darah sepenuhnya seringkali tidak memungkinkan. Namun, transfusi tidak boleh ditunda pada pasien dengan anemia berat yang mengancam jiwa atau mereka yang mengalami hemolisis berat dan manifestasi klinis yang berkembang pesat. Transfusi dapat menyelamatkan nyawa untuk AIHA yang parah, dan ketakutan untuk mentransfusikan eritrosit yang tidak sesuai seharusnya tidak mencegah prosedur ini. Komunikasi dini antara dokter dan layanan transfusi sangat penting meminimalkan keterlambatan transfusi darah



dan untuk mengidentifikasi unit darah yang optimal untuk transfusi. Alloantibodi dapat terbentuk setelah terpapar darah yang ditransfusikan, tetapi ditutupi adanya autoantibodi hangat. Alloantibodi yang mempersulit transfuse telah diaporkan di 32% dan AIHA, menyebabkan hemolisis yang memburuk. Dalam kasus yang mendesak dan ketika kehadiran aloantibodi tidak mungkin (tidak ada riwayat transfusi sebelumnya, kehamilan, atau transplantasi organ), kemasan kompatibel ABO dan RhD Unit RBC dapat diberikan dengan aman. Dalam kasus yang tidak terlalu mendesak, mengesampingkan kehadiran alcantibodi dengan teknik autoadsorpsi hangat atau adsorpsi alogenik, atau bila mungkin, transfusi PRBC yang cocok secara fenotip, disarankan secara berurutan untuk meminimalkan risiko memburuknya hemolisis setelah transfusi. Saat transtusi diberikan, unit sel darah merah yang dikemas harus dikurangi leukositnya untuk menurunkan risiko reaksi demam yang diakibatkan oleh antibodi anti-leukosit. Darah harus ditransfusikan secara relatif lambat dan volume yang ditransfusikan dibatasi hingga tujuan memperbaiki anemia yang mengancam jiwa, yang dimanifestasikan oleh gangguan neurologis atau kardiovaskular yang kolaps, dan belum tentu mencapai konsentrasi hemoglobin normal. Transfusi berlebihan dapat dikaitkan dengan peningkatan hemolisis karena peningkatan massa sel darah merah, yang dapat disalahartikan sebagai aloimunisasi. Beberapa penulis menyarankan "uji kompatibilitas *in vivo*" dengan memasukkan volume kecil dari 20 mL RBC yang dikemas, diikuti dengan 20 menit pengamatan untuk reaksi sebelumnya melanjutkan dengan sisa transfusi (Niss and Ware, 2018)



2.1.7.2 Kortikosteroid

Meskipun kurangnya studi sistematis, ada konsensus umum tentang kortikosteroid adalah terapi "lini pertama" paling efektif untuk pasien dengan AIHA tipe hangat. Untuk presentasi klinis yang parah, metilprednisolon intravena harus diberikan dengan dosis 1–4 mg / kg / hari, dibagi setiap 6–8 jam. Transisi ke prednison oral atau prednisolone kemudian dicapai dengan 1–2 mg / kg / hari, biasanya dibagi menjadi dua atau tiga dosis, yang dipertahankan selama 2-3 minggu sampai konsentrasi hemoglobin paling sedikit 10-11 g/dL dicapai tanpa dukungan transfusi.

Laboratorium tambahan harus menunjukkan pengurangan retikulositosis, tetapi DAT mungkin masih positif. Dosis steroid yang lebih tinggi, hingga 1000 mg metilprednisolon setiap hari atau 30 mg/kgBB/hari pada pediatri selama 3 hari, telah digunakan dalam beberapa seri kasus orang dewasa dan anak, biasanya dalam keadaan akut. Untuk presentasi klinis yang tidak terlalu parah, kortikosteroid oral dapat menjadi pilihan pengobatan awal. Jika konsentrasi hemoglobin yang stabil dapat dipertahankan tanpa transfusi, kortikosteroid oral dapat diturunkan cukup cepat dalam 1-2 bulan pertama, bertujuan untuk rejimen dosis harian tunggal yang mempertahankan jumlah stabil diikuti dengan yang lebih lambat meruncing selama beberapa bulan. Meskipun tingkat respon awal yang tinggi terhadap steroid mendekati 80% secara historis, relaps sangat umum terjadi selama pengurangan steroid. Dalam uji coba acak baru-baru ini (N = 64), 50% orang dewasa yang baru didiagnosis dengan AIHA diobati dengan prednisolon saja mencapai respon lengkap atau parsial pada 3 bulan, sementara hanya 36% tetap dalam remisi pada 12 bulan. Durasi pendek dosis pemeliharaan dan pengurangan cepat kortikosteroid berhubungan dengan risiko



kambuh meningkat, sedangkan risiko kekambuhan lebih rendah pada pasien yang menerima kortikosteroid selama lebih dari 6 bulan. Oleh karena itu, tapering selanjutnya dosis kortikosteroid setelah 1–2 bulan pertama harus terjadi lebih lambat selama setelah 4–6 bulan dengan pemantauan ketat dari konsentrasi hemoglobin dan jumlah retikulosit. Penghentian steroid hanya boleh dipertimbangkan di pasien yang stabil dengan dosis rendah (≤ 10 mg/hari) setelah setidaknya 4 bulan pengobatan kortikosteroid, dan harus diperpanjang setidaknya 1–2 bulan. Meskipun tidak ada konsensus tentang definisi respon pengobatan di antara berbagai penelitian, pasien yang gagal mencapai perbaikan konsentrasi hemoglobin setelah 3 minggu kortikosteroid atau tidak dapat menghentikan dukungan transfusi umumnya dianggap resisten. Evaluasi ulang diagnostik dan tambahan terapi harus dipertimbangkan pada pasien ini. Selain itu, pasien yang membutuhkan kortikosteroid dosis tinggi untuk mempertahankan remisi atau tidak mentolerir kortikosteroid harus dipertimbangkan sebagai kandidat untuk pilihan pengobatan lini kedua karena untuk kekhawatiran tentang efek pengobatan jangka panjang, terutama pada pertumbuhan dan kesehatan tulang. Di antara pasien yang merespon terapi awal, hanya ~ 50% dari pasien dapat dipertahankan dalam remisi dengan dosis steroid yang "dapat diterima", didefinisikan sebagai dosis prednison < 15 mg / hari pada orang dewasa atau $< 0,1-0,2$ mg/kg/hari pada pediatric (Niss and Ware, 2018)



2.1.7.3 Terapi target saat ini dan yang sedang berkembang di AIHA

a. Terapi yang menargetkan limfosit B

Diketahui dengan baik bahwa limfosit B adalah efektor utama kekebalan humoral dengan mengeluarkan antibodi, tetapi bertindak juga sebagai sel APC, menghasilkan sitokin immunoregulasi, dan mengekspresikan ko-stimulasi permukaan molekul. Limfosit B antigen CD20 adalah aktivasi-terglikosilasi fosfoprotein diekspresikan pada permukaan semua sel B pada fase awal pro-B (CD45R+, CD117+) dan semakin meningkat dalam konsentrasi sampai matang. CD20 tidak memiliki ligan alami yang diketahui dan diduga bertindak sebagai saluran kalsium di membran sel, memungkinkan respon imun sel B yang optimal, khususnya melawan antigen T-independent. Dalam beberapa tahun terakhir, antibodi monoklonal anti CD 20, Rituximab telah menjadi lini kedua yang disukai pilihan untuk wAIHA yang refrakter terhadap steroid. Obat itu, pertama kali dikembangkan pengaturan keganasan limfoid, juga efektif pada rheumatoid arthritis, lupus eritematosus sistemik (SLE), multiple sklerosis, dan beberapa penyakit autoimun hematologi seperti trombositopenia imun primer (ITP), hemofilia didapat, dan purpura trombositopenik trombositik (Barcellini dan Zanela, 2011; Visentini *et al.*, 2015). Tentang AIHA, rituximab efektif pada idiopatik dan bentuk sekunder, termasuk yang terkait dengan gangguan autoimun dan limfoproliferatif, dan transplantasi sumsum tulang. Seperti diberitakan di beberapa studi dan dalam analisis meta baru-baru ini, tingkat respons keseluruhan (ORR) pada wAIHA ~ 80%, dengan kelangsungan hidup bebas relaps ~ 60% pada 3 tahun, dan waktu rata-rata untuk merespons sekitar 3–6 minggu (kisaran 2–16). Regimen standar adalah 375 mg / m² setiap minggu selama 4 minggu, tetapi juga rejimen lain



(1 g pada hari 1 dan 15) dan dosis rendah (100 mg dosis tetap mingguan x 4) sama efektifnya pada AIHA primer dan sekunder untuk berbagai penyakit autoimun.

Rituximab memiliki profil keamanan yang baik dan juga perawatan ulang efektif, meskipun risiko immunosupresi seharusnya perlu diingat, mendorong profilaksis

hepatitis virus yang memadai pengaktifan kembali. Obat tersebut juga telah digunakan pada lini pertama atau sedini mungkin lini kedua bersamaan dengan steroid, terutama

pada kasus wAIHA berat (Laribi *et al.*, 2016). Mengenai CAD, rituximab sekarang direkomendasikan sebagai pengobatan lini pertama, mengingat kemanjuran steroid

yang terbatas dan adanya klon sel-B pada kebanyakan pasien yang didiagnosis dengan CAD utama. Namun, tanggapan terjadi dalam waktu kurang dari 50% dengan

sangat sedikit tanggapan lengkap dan dengan durasi median kurang dari 12 bulan.

Lini terapi selanjutnya adalah kombinasi dengan bendamustine (rituximab 375 mg / m² hari 1 dan bendamustine 90 mg/m² hari ke-1 dan ke-2 selama empat siklus pada

Interval 28 hari) yang menyebabkan 71% ORR (40% selesai). Rituximab pada dosis standar juga telah dikombinasikan dengan fludarabine oral (40 mg/m² pada hari 1–5

dari empat siklus 28 hari) dengan 76% respons keseluruhan (OR) (21% selesai) tetapi dengan efek samping parah (kebanyakan toksisitas hematologi tingkat 3-4) di 41%

kasus. Akhirnya, rituximab telah berhasil digunakan bersama dengan siklofosamid dan deksametason, atau dengan antibodi monoklonal anti-CD52 alemtuzumab (Hill,

et al., 2017)

b. BCR dan proteasome inhibitor

Diketahui bahwa BCR mengontrol aktivasi dan diferensiasi limfosit B selanjutnya menjadi antibody sekresi PC dan memori sel B. Agregasi BCR dengan



cepat mengaktifkan beberapa tirosin kinase, termasuk fosfatidylinositol 3-kinase (PI3Ks) dan Bruton tirosin kinase (BTK) yang berperan penting dalam perkembangan dan fungsi sel B. Penargetan rejimen pengobatan BCR didasarkan pada asosiasi yang erat dan beberapa mekanisme patogenetik umum antara penyakit limfoproliferatif dan autoimun. Penghambat BTK (BTKis), ibrutinib dan acalabrutinib, disetujui secara bervariasi untuk / dalam penyelidikan di beberapa gangguan limfoproliferatif, termasuk limfositik kronis leukemia (CLL), makroglobulinemia Waldenström, dan mantel limfoma sel. Ibrutinib telah terbukti efektif dalam kasus AIHA yang berhubungan dengan CLL dan limfoma (Manda *et al.*, 2015; Galinier, *et al.*, 2017). Oleh karena itu, BTKis adalah golongan obat yang berpotensi menarik untuk pengelolaan wAIHA primer yang refrakter dan CAD. Demikian juga, BCL2 inhibitor venetoclax, diindikasikan untuk pengobatan lini kedua CLL dengan penghapusan 17p, memiliki peran potensial untuk AIHA refrakter. Kelas inhibitor BCR lain yang menjanjikan ditujukan terhadap PI3K. Sinyal PI3K5 menyimpang mengaktifkan dan menginduksi proliferasi sel B self-reaktif yang menghasilkan autoantibodi, bertindak sebagai APC yang menghadirkan antigen sendiri ke sel T autoreaktif, dan menghasilkan sitokin pro-inflamasi. Apalagi, PI3K inhibitor telah terbukti mengurangi insiden dan keparahan dari artritis autoimun, asma, ensefalomielititis autoimun eksperimental, dan SLE dalam model tikus. Namun, idelalisib, suatu PI3K inhibitor yang saat ini digunakan dalam CLL, telah menunjukkan insidensi yang tinggi komplikasi autoimun, termasuk hepatitis autoimun, kolitis, dan pneumonitis, meningkatkan beberapa kekhawatiran tentang penggunaannya di AIHA. Terakhir, proteasome inhibitor bortezomib yang diketahui memiliki efek apoptosis pada PC yang mensekresi Ig dan menunjukkan kemanjuran



pada penyakit penghasil Ig, seperti multiple myeloma, amiloidosis rantai ringan, dan makroglobulinemia Waldenström. Itu terbukti efektif dalam beberapa kasus AIHA yang kambuh / refrakter sebagai monoterapi atau terkait dengan obat sitotoksik. Baru-baru ini, suatu multicenter, studi fase 2 menunjukkan bahwa dosis tunggal bortezomib (1,3 mg / m²) menyebabkan ORR pada 31% pasien yang mendapat perlakuan awal berat dan pasien CAD yang bergantung pada transfusi, dengan toksisitas yang dapat diterima, dan mempunyai respon manfaat jangka panjang pada mayoritas pasien (Rossi *et al.*, 2018)

c. Terapi yang bekerja berdasarkan komplemen

Aktivasi jalur komplemen klasik sangat tinggi diinduksi oleh IgM dan pada tingkat yang lebih rendah oleh isotipe IgG1 dan IgG3. Deposisi C3c dan C3d pada RBC terdeteksi oleh DAT sebagian besar disebabkan oleh IgM yang umumnya lolos dari deteksi (antibody tersembunyi). Autoantibodi IgM ditemukan secara khas dalam CAD dan dapat mengaktifkan komplemen saat kisaran termal mendekati suhu fisiologis, atau ketika darah terkena suhu yang lebih rendah di permukaan tubuh atau ekstremitas. Subclass IgM dan IgG yang mengaktifkan komplemen mungkin hadir dalam persentase yang cukup besar dari wAIHA (~ 30% kasus), berakibat parah dan sering mengaktifkan komplemen secara *in vivo*. Aktivasi komplemen dapat menentukan hemolisis ekstravaskular di limpa, hati, dan organ limfoid melalui sistem fagosit mononuklear. Atau, juga dapat menyebabkan hemolisis intravaskular yang berbahaya, menginduksi sel lisis melalui kompleks komplemen terminal atau kompleks serangan membran (C5b, C6, C7, C8, dan beberapa molekul C9). Faktanya, diperkirakan bahwa jumlah kerusakan sel darah merah oleh hemolisis



intravaskular sekitar dalam 200 mL sel darah merah dalam 1 jam, sedangkan 10 kali lipat lebih rendah hemolisis ekstravaskular, dengan konsekuensi klinis yang jelas berbeda. Apalagi AIHA dengan keterlibatan komplemen (IgG + C tipe hangat, mixed, dan CAD) lebih sering membutuhkan terapi lini kedua atau selanjutnya, yang menunjukkan peran utama ini sistem amplifikasi yang kuat dalam tingkat disregulasi kekebalan (Barcelini *et al.*, 2018)

Berdasarkan pertimbangan di atas, blokade komplemen dapat secara rasional menghentikan atau mengurangi hemolisis yang sedang berlangsung di AIHA, terutama pada fase akut. Eculizumab, antibodi monoclonal anti-C5, adalah inhibitor komplemen pertama yang dikembangkan dan sekarang memiliki peran yang mapan dalam pengobatan hemoglobinuria nokturnal paroksismal (PNH). Itu telah digunakan pada CAD parah / refraktori, menunjukkan penurunan yang signifikan dalam LDH, stabilisasi hemoglobin, penghindaran transfusi, dan tidak adanya peristiwa trombotik, dibandingkan dengan temuan sebelum terapi. Namun, eculizumab efektif pada hemolisis intravascular saja, yang bukan merupakan mekanisme utama wAIHA dan juga pada CAD, setidaknya pada penyakit stabil / kronis dimana fiksasi komplemen pada RBC terjadi sebelum komponen C5. Secara konsisten, blokade C5 diinduksi oleh pengobatan eculizumab pada PNH telah terbukti meningkatkan deposisi C3 pada RBC, sehingga mendukung perkembangan hemolisis ekstravaskular pada penyakit ini awalnya ditandai dengan hemolisis intravaskular 'murni'. Oleh karena itu, penghambat komplemen lain itu bertindak sebagai hulu dalam kaskade komplemen telah dikembangkan dan saat ini dalam uji klinis. BIV009, nama generik sutimimab (sebelumnya TNT003), adalah IgG4 MoAb yang secara khusus menghambat C1s dan



membatalkan hemolisis mediasi komplemen in vitro (Shi et al., 2014). Dalam uji coba fase 1 dengan CAD primer, pengobatan BIVV009 terbukti mampu menormalkan hemoglobin tingkat di semua pasien yang dirawat (Hb rata-rata meningkat 4 g/dL). Seperti yang diharapkan, hemolisis dan anemia kambuh saat kadar obat hilang dan penggunaan kembali obat tersebut meningkatkan kembali kemanjurannya dengan durasi jangka panjang. Mengingat pendahuluan ini menggembirakan Hasilnya, BIVV009 kini telah memasuki uji coba fase 3 (NCT03347396, NCT03347422). APL-2, peptida siklik sintesis terkonjugasi dengan polimer polietilen glikol yang mengikat khusus untuk C3 dan C3b (3 jalur inhibitor), telah menunjukkan suatu profil efikasi / keamanan yang baik pada fase 1 (Grossi et al., 2016). Uji coba yang sedang berlangsung menilai kemanjuran awal pada pasien dengan kedua AIHA, tipe hangat dan dingin (NCT03226678). Akhirnya, molekul inhibitor terhadap C1q, ANX005, telah terbukti memblokir aktivasi komplemen klasik dan hemolisis secara uji in vitro pada sel darah merah domba (Gerzt, et al., 2016) dan sedang dalam peneyelidikan uji klinis fase 1 (NCT03010046). Penghambat komplemen lainnya (compstatin, TT30 MoAb, faktor mini H, larut rekombinan CR1) saat ini sedang dalam pengembangan di PNH dan mungkin akan dikembangkan pada AIHA (Risitano and Marotta, 2018). Secara keseluruhan, blokade komplemen jangka panjang menimbulkan kekhawatiran yang signifikan tentang risiko infeksi, khususnya dari bakteri meningokokus, yang perlu dicegah dengan jadwal vaksin yang tepat dan, pada akhirnya, antibiotik jangka panjang. Hal ini sudah dihadapi pada PNH tetapi membutuhkan perhatian lebih lanjut dalam AIHA, karena yang mendasarinya disregulasi imun dan pengobatan immunosupresif sebelumnya (Benamu and Montoya, 2016)



d. Terapi yang bekerja pada imunitas seluler dan sitokin

Meskipun AIHA adalah model klasik auto-imunitas humoral, sebagai antibody anti-RBC yang disekresikan oleh limfosit B dan PC, bersilangan dengan APC, limfosit T, dan sitokin pasti terlibat. Peran yang sangat kompleks dimainkan oleh sel T regulasi (Treg) yang sangat penting dalam mencegah reaksi autoimun. Sel T CD4+ Treg yang beredar ditemukan berkurang di pasien dengan AIHA, bersama dengan meningkatnya interleukin (IL) -10 dan IL-12, dan menunjukkan beberapa korelasi dengan parameter hematologi parameter. Ward dkk. menjelaskan autoantigen spesifik, klon Treg yang mensekresi IL-10 memulihkan pasien AIHA secara *ex vivo*. Jumlah Treg ini mengekspresikan kadar CD25 dan LAG-3 yang tinggi saat berkembang nonspesifik, tapi FoxP3 setelah aktivasi oleh autoantigen. Mengingat, yang diketahui kemampuan IL-2 untuk mengembangkan sel CD8+ T-regulator *in vitro*, sebuah percobaan yang sedang berlangsung sedang mengevaluasi kemanjuran IL-2 dosis rendah yang diberikan secara subkutan pada pasien dengan wAIHA [NCT02389231]. Beberapa kelainan imunoregulasi sitokin lainnya telah dilaporkan di AIHA, termasuk peningkatan kadar IL-4, IL-12, IL-13, dan IL-21 dalam serum dan / atau dalam eksperimen kultur. Selain itu, penambahan IL-4, IL-6, IL-10, IL-13, dan faktor pertumbuhan transformasi beta (TGF- β) meningkat sekresi autoantibodi dalam kultur. Akhirnya, sel-B aktivasi factor kelompok tumor nekrosis factor (TNF) dan proliferation-inducing ligand (APRIL) baru-baru ini ditemukan meningkat di AIHA, membuka pilihan terapeutik di masa depan dengan antibody monoklonal yang diarahkan melawan faktor-faktor ini, seperti belimumab (Xu *et al.*, 2015; Lenert and Lenert, 2015)



Target potensial lainnya adalah serine treonine kinase mammalian target of rapamycin (mTOR), bagian dari reseptor sel-T jalur hilir, yang mengatur sintesis protein, pertumbuhan, proliferasi, dan aktivasi sel T. Berbagai mTOR inhibitor tersedia, sebagian besar telah digunakan dalam penyakit limfoproliferatif dan sebagai antireject pada transplantasi organ padat dan sumsum tulang, tetapi data telah dilaporkan bahkan mengenai penyakit autoimun. Secara khusus, sirolimus telah terbukti efektif dalam AIHA multirefrakter pasca transplantasi (baik setelah transplantasi organ padat atau sel induk hematopoietik) dan dalam kasus anak-anak dengan sindrom Evans (Park, *et al.*, 2016; Jasinski, *et al.*, 2017)

e. **Terapi yang bekerja pada monosit / makrofag dan sel 'inflamasi' lainnya**

Monosit dan makrofagnya serta keturunannya memiliki beberapa fungsi kekebalan, seperti presentasi antigen, produksi sitokin, dan fagositosis komplement atau target antibody-opsonin. Mereka adalah pengatur utama respon peradangan, bersama dengan sel T-helper 17 subset dari sel T-helper pro-inflamasi yang mengeluarkan IL-17, dan melawan aksi Tregs. Pembentukan Th17 diatur oleh beberapa sitokin, termasuk TGF- β , IL-6, IL-21, dan IL-23. Pada AIHA, kadar IL-1 dan IL-6 serum ditemukan meningkat, dan produksi IL-6 dan IL-17 dalam kultur dilaporkan meningkat dibandingkan dengan kontrol yang sehat. Pasien dengan hemolisis aktif menunjukkan peningkatan sekresi TGF- β , dan penambahan TGF- β pada kultur sel pasien AIHA meningkatkan sekresi autoantibodi. Peningkatan frekuensi sel Th17 dan peningkatan sekresi IL-17 ditemukan berkorelasi erat dengan aktivitas penyakit pada pasien AIHA. Secara konsisten, pada tikus model AIHA, transfer adopsi sel Th17 meningkatkan respon antibodi anti-RBC dan mendukung timbulnya AIHA, sedangkan



onset penyakit dihilangkan dengan netralisasi IL-17 secara *in vivo*. Secara keseluruhan, temuan ini menunjukkan peningkatan tingkat TGF- β mendukung diferensiasi subset Th17, yang memperkuat pro-inflamasi dan respon autoimun. Dalam pandangan ini, obat yang menjanjikan adalah luspatercept (ACE-536), fusi protein baru yang memblokir superfamili TGF- β inhibitor eritropoiesis, yang telah terbukti efektif dalam meredakan anemia pada sekitar dua pertiga pasien dengan sindrom myelodysplasia (MDS) risiko rendah (Barcellini, *et al.*, 2018)

Menargetkan hemolisis ekstravaskular yang digerakkan oleh IgG, sitokin pro-inflamasi juga merupakan pendekatan yang menarik di AIHA. Fostamatinib adalah tersedia oral, yaitu inhibitor spleen tirosin kinase (Syk) tirosin kinase nonreseptor yang diekspresikan secara luas yang terlibat dalam proliferasi, diferensiasi, dan fagositosis. Penghambatan syk-kinase menyebabkan penekanan sel mast, makrofag, dan sel B dan terkait respon inflamasi dan kerusakan jaringan. Potensi anti inflamasi dan aktivitas imunomodulasinya sangat diminati semua penyakit yang dipicu oleh IgG, dan temuan yang menjanjikan telah ditemukan dijelaskan dalam rheumatoid arthritis dan pengobatan ITP kronis (Newland, *et al.*, 2018). Obat tersebut saat ini sedang diteliti, dicoba pada dosisnya dari 150 mg dalam percobaan multicenter fase 2 pada wAIHA (NCT02612558). Pendekatan menarik lainnya adalah penargetan FcRn (neonatal crystallizable fragment receptor). Selaput FcRn IgG yang beredar, termasuk autoantibodi patogen, melindungi mereka dari katabolisme dan mengatur respon bawaan dan adaptif yang diprakarsai oleh kompleks imun IgG. Sifat-sifat ini membuat FcRn menjadi target potensial untuk terapi imun pada penyakit autoimun yang dimediasi IgG. SYNT001 adalah human-de-immunized IgG4 MoAb yang menargetkan



dan mengikat ke FcRn di situs pengikatan IgG, dan memblokir interaksi antara molekul FcRn dan IgG, mengubah homeostasis IgG dan kekebalan bawaan dan adaptif.

SYNT001 dapat ditoleransi dengan baik dan menghasilkan penurunan cepat di semua subclass IgG pada sukarelawan yang sehat dalam penelitian pertama pada manusia

(Blumberg, et al., 2017). Suatu studi multicenter fase 1b saat ini sedang mengevaluasi SYNT001 pada pasien dengan wAIHA kronis untuk menilai keamanan, tolerabilitas, dan aktivitas dalam pengaturan ini (NCT03075878).

f. Terapi yang bekerja pada sumsum tulang

Sumsum tulang tidak diragukan lagi merupakan organ penting hematopoietik dan juga elemen kunci dari sistem limfatik / kekebalan, menghasilkan sekitar 500 miliar sel darah / hari, termasuk garis keturunan myeloid dan limfoid. Yang terakhir, setelah menyelesaikan pematangannya di organ limfoid lainnya (misalnya timus), dan melalui sirkulasi dan jaringan, mungkin menjadi efektor kekebalan yang sebenarnya bahkan di sumsum tulang. Pemeriksaan sumsum tulang tidak rutin dilakukan pada hematologi jinak, karena umumnya diasumsikan bahwa aktivitas kompensasi yang efektif (retikulositosis) terjadi terus-menerus setelah kerusakan yang dimediasi oleh imun perifer. Memang, retikulositopenia / retikulositosis yang tidak adekuat ada pada lebih dari setengah dari pasien AIHA, biasanya pada kasus yang sangat parah dan pada CAD dan bentuk mixed. Retikulositopenia telah dilaporkan secara khusus pada anak-anak, mewakili keadaan darurat klinis dengan kebutuhan transfusi yang sangat tinggi, dan juga dikaitkan dengan reaksi autoimun terhadap eritroblas sumsum tulang (Barcellini, et al., 2018). Erythropoietin telah terbukti efektif dalam AIHA, khususnya pada kondisi retikulositopenia dan kronis, CAD-tergantung transfusi untuk menghindari



overtransfusi. Bahkan, androgen danazol baru-baru ini mendapat perhatian karena mempunyai efek yang menjanjikan pada anemia aplastik (AA), penyakit yang dikenal serangan imunologi terhadap prekursor sumsum tulang (Townslley dan Winkler, 2016; Khurana, *et al.*, 2018). Dalam pengaturannya, kemanjurannya mungkin dikaitkan dengan pemanjangan telomer. Faktanya, obat ini telah digunakan sejak lama pada penyakit autoimun termasuk AIHA, tanpa mengetahui mekanisme tindakan yang pasti (Barcelini, *et al.*, 2018)

2.2 Mekanisme imun hilangnya toleransi self

Toleransi imunologis adalah keadaan di mana individu tidak mampu mengembangkan respons imun terhadap antigen tertentu. Toleransi self mengacu pada kurangnya respons terhadap antigen self individu yang merupakan keadaan normal. Hasil autoimunitas dari hilangnya toleransi self, menyebabkan sel T atau antibodi bereaksi terhadap antigen sendiri dan mengakibatkan cedera jaringan. Dalam AIHA, autoantibodi diarahkan terhadap target pada sel darah merah individu ("antigen self"), yang mengarah ke peningkatan klirens melalui fagositosis yang dimediasi reseptor Fc ("hemolisis ekstravaskular") atau lisis yang dimediasi komplemen ("hemolisis intravaskular"). AIHA mungkin sebagian besar karena antibodi reaktif self terhadap pita eritrosit 3, *transporter* anion yang ditemukan di membran RBC yang terlibat dalam penuaan sel darah merah. (Friedberg, 2019)



2.2.1 Toleransi Sentral

Toleransi sentral mengacu pada delesi normal klon limfosit T dan B yang reaktif *self* selama maturasinya di organ limfoid sentral (timus untuk sel T; sumsum tulang untuk sel B). Toleransi sentral mencegah autoimun yang meluas dengan cara memilih khusus sel T nonautoreaktif (yaitu, "Normal") untuk masuk ke sirkulasi perifer ("seleksi negatif intrathymic"). Toleransi sentral tidak begitu lengkap, dan populasi sel T dengan aviditas menengah untuk antigen *self* selalu lolos ke sirkulasi.

Dalam kondisi tertentu, sel-sel ini dapat menjadi aktif dan menyebabkan penyakit autoimun spesifik organ atau sistemik. (Friedberg, 2019)

2.2.2 Toleransi Perifer

Mekanisme dimana sel T autoreaktif yang lolos dari seleksi negatif *Intrathymic* dan didelesi di jaringan perifer yang membentuk toleransi perifer, termasuk anergi, supresi oleh sel T regulator, dan delesi klonal oleh induksi kematian sel. Anergi mengacu pada inaktivasi fungsional limfosit yang berkepanjangan atau *irreversible*.

Aktivasi sel T spesifik antigen membutuhkan dua sinyal. (a) pengenalan antigen peptida dalam kaitannya dengan molekul *self*-major histocompatibility complex (MHC) pada permukaan sel penyaji antigen (*Antigen Presenting cell* (APC)) dan (b) satu set sinyal kostimulatori yang disediakan oleh APC (costimulator B7-1 dan B7-2). Dengan tidak adanya ko-stimulator, sinyal negatif dikirim, dan limfosit T menjadi anergik.

Limfosit anergik tidak dapat diaktifkan bahkan jika antigen yang relevan disajikan oleh APC (misalnya, sel dendritik) yang dapat memberikan ko-stimulasi. Anergi juga mempengaruhi sel B karena mereka melawan antigen tanpa adanya sel T helper.



Mereka menjadi tidak dapat merespons rangsangan antigenik berikutnya dan mungkin akan dikeluarkan dari folikel limfoid (Friedberg, 2019).

Supresi oleh sel T regulator melibatkan sel CD4 + yang ikut mengekspresikan CD25, rantai α dari reseptor Interleukin-2 (IL-2), tetapi beberapa sel CD4 + yang kekurangan CD25 juga dapat menyebabkan toleransi perifer dengan supresi. Sel T ini dapat mensupresi (menghambat) aktivasi limfosit dan sebagian fungsi efektor oleh sekresi sitokin seperti IL-10 dan mengubah *growth factor*- β . Namun, mekanisme aksi lebih tepatnya tidak diketahui.

Penghapusan klonal oleh aktivasi kematian sel mengacu pada proses di mana sel CD4 + T yang diaktifkan oleh antigen *self* dapat menerima sinyal yang menyebabkan apoptosis. Limfosit mengekspresikan Fas (CD95), anggota famili reseptor *tumor necrosis factor* (TNF), dan limfosit aktif mengekspresikan FasL, protein membran yang secara struktural homolog dengan sitokin TNF. Keterlibatan Fas oleh FasL menginduksi apoptosis sel T autoreaktif yang teraktivasi. Self-antigen yang melimpah di jaringan perifer menyebabkan stimulasi berulang dan persisten dari sel T spesifik antigen sendiri, yang pada akhirnya mengarah ke eliminasi melalui apoptosis yang dimediasi Fas. FasL pada sel T yang melibatkan Fas pada sel B juga dapat melakukan delesi sel B yang reaktif *self* (Friedberg, 2019)

Autoimunitas dapat dipengaruhi oleh sejumlah faktor yang berbeda, termasuk sifat autoantigen, asosiasi genetik, dan faktor lingkungan. pada AIHA, epitop sel T autoantigenik telah dipetakan untuk autoantigen RhD. Meskipun sisi autoantigenik ini mungkin menjadi target potensial untuk intervensi terapeutik baru, mekanisme yang



tepat dari inisiasi penyakit ini masih belum jelas. Selain itu, gen MHC kelas I dan kelas II dapat mempengaruhi individu terhadap jenis penyakit autoimun tertentu. Misalnya, molekul (HLA) -DQ-6 telah dikaitkan dengan kejadian AIHA. Namun, asosiasi genetik ini masih multifaktorial seperti kebanyakan penyakit autoimun lainnya. Akhirnya, stimuli inflamasi seperti infeksi virus dan bakteri telah terlibat sebagai pemicu lingkungan dari autoimunitas, mungkin karena mimikri antigenik yang mengarah ke gangguan toleransi, yaitu, agen lingkungan atau infeksi mungkin memiliki struktur molekul yang mirip dengan antigen self. Mekanisme lain yang mungkin melibatkan produksi interferon γ selama infeksi virus yang menyebabkan peningkatan regulasi FcRI. mekanisme alternatif lain yaitu infeksi virus dapat menyebabkan perubahan pola ekspresi reseptor Fc sebagai akibat aktivasi transkripsi atau mekanisme lain. (Friedberg, 2019)

2.3 Sel T CD4+ Dalam Imunitas dan Autoimunitas

Sistem imun dibagi menjadi 2 tipe, yaitu sistem imun adaptif dan *innate*. Sistem imun *innate* bersifat non spesifik, yang berarti sebagai pertahanan cepat, karena diinisiasi dalam beberapa jam setelah paparan dengan benda asing atau infeksi, meliputi neutrofil, sel dendritik, makrofag, sel mast, sel natural killer, limfosit T natural killer dan T limfosit *delta gamma*. Pada imunitas *innate*, semua sel dapat memproduksi sitokin *innate* terutama sitokin IL-1, IL-6, IL-8 dan TNF- α yang dapat mendukung respon adaptif, proses diferensiasi dan aktivasi limfosit T (Burkett *et al.*, 2019; Mahaki *et al.*, 2019)



Sel T sangat penting untuk mengeliminasi mikroba yang bertahan hidup dan berreplikasi di dalam sel dan untuk memberantas infeksi oleh beberapa mikroba ekstraseluler, seringkali dengan merekrut sel lain untuk membersihkan patogen infeksius. Respon sel imun yang dimediasi dimulai dengan aktivasi sel T naif untuk berkembang biak dan berdiferensiasi menjadi sel efektor. Sel T efektor ini kemudian bermigrasi ke tempat infeksi, dan berfungsi untuk mengeliminasi mikroba (Abbas *et al*, 2016).

Infeksi mikroba dapat terjadi di mana saja di tubuh, dan beberapa patogen infeksius dapat menginfeksi dan hidup di dalam sel inang. Mikroba patogen yang menginfeksi dan bertahan hidup di dalam sel inang termasuk (1) bakteri, jamur, dan protozoa yang tertelan oleh fagosit tetapi melawan mekanisme pembunuhan fagosit ini dan dengan demikian bertahan dalam vesikel atau sitosol, dan (2) virus yang menginfeksi fagosit dan sel nonfagosit dan bereplikasi di sitosol sel ini. Kelas sel T yang berbeda mengenali mikroba di kompartemen seluler yang berbeda dan berbeda dalam sifat reaksi yang mereka hasilkan. Secara umum, sel T CD4⁺ mengenali antigen mikroba dalam vesikula fagositik dan mengeluarkan sitokin yang merekrut dan mengaktifkan leukosit yang membunuh mikroba, sedangkan sel T CD8⁺ mengenali antigen mikroba yang ada di dalam sitosol dan menghancurkan sel yang terinfeksi.

Imunitas seluler terhadap patogen ditemukan sebagai bentuk imunitas terhadap infeksi bakteri intraseluler yang dapat ditransfer dari imun ke naif melalui sel (sekarang dikenal sebagai limfosit T) tetapi tidak oleh antibodi serum. Telah diketahui dari penelitian bahwa spesifisitas imunitas yang dimediasi sel terhadap mikroba yang berbeda adalah fungsi limfosit, tetapi eliminasi mikroba adalah fungsi makrofag yang



teraktivasi. Seperti yang telah disebutkan, sel T CD4+ terutama bertanggung jawab atas jenis klasik imunitas yang dimediasi oleh sel ini, sedangkan sel T CD8 + dapat memberantas infeksi tanpa harus menggunakan fagosit. (Abbas *et al.*, 2016)

Imunitas adaptif utamanya diperantarai oleh sel limfosit T. Limfosit dapat diklasifikasikan menjadi beberapa populasi menggunakan sejumlah operasional dan parameter fenotip. Sebagai contoh, sel limfosit T CD4+ mengekspresikan baik CD3 dan CD4, sel limfosit T CD8+ akan mengekspresikan penanda permukaan membran

CD3 dan CD8, sedangkan subset CD45RA menggambarkan populasi sel T *helper* naive dan subset CD45RO menggambarkan populasi sel T *helper* memori. Sel-sel T *helper* (Th) CD4+ *self-reactive* memiliki peran penting dalam patogenesis banyak penyakit autoimun pada manusia. Hal ini sebagian disebabkan oleh kemampuan unik sel-sel Th untuk berdiferensiasi menjadi subset-subset yang berbeda, yang dibagi menjadi 5 jenis besar setelah bertemu dengan *antigen presenting cell*, yaitu sel T sitotoksik, Sel T *helper* 1, sel T *helper* 2, sel T *helper* 17, dan sel T *induced regulatory*.

Subset-subset ini dikhususkan pada perekrutan dan koordinasi mekanisme-mekanisme efektor imun yang berbeda, sebagian besar melalui sekresi sejumlah sitokin dan kemokin (Turgeon, 2014; Abbas, Lichtman and Pillai, 2016).

Sel-sel Th1 berperan penting dalam menginduksi respons imun protektif terhadap patogen-patogen intraseluler seperti *Mycobacterium tuberculosis* atau *Listeria monocytogenes*. Sitokin polarisasi kunci yang menginduksi diferensiasi sel T naif menjadi sel Th1 adalah IL-12, IL-18, dan IFN- γ . IL-12 diproduksi oleh sel dendritik setelah pertemuan dengan suatu patogen. Ekspresi IL-12 juga diregulasi dalam merespon IFN- γ yang dihasilkan oleh sel T dan sel NK yang teraktivasi. IL-18, yang



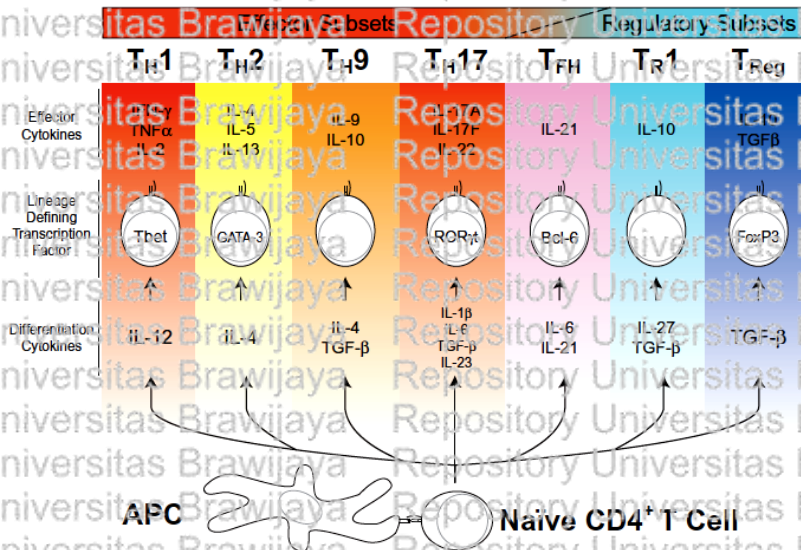
juga diproduksi oleh sel dendritik, mendorong proliferasi perkembangan sel Th1 dan meningkatkan produksi IFN- γ . Sitokin-sitokin tersebut memicu jalur sinyal dalam sel T naif untuk meningkatkan ekspresi pengatur gen master T-Bet, yang mana menginduksi ekspresi sitokin efektor tipe 1, meliputi: IFN- γ dan TNF. IFN- γ merupakan sitokin efektor tipe 1 yang sangat kuat, yang dapat mengaktifkan makrofag, merangsang sel-sel ini untuk meningkatkan aktivitas mikrobisidal, mengatur molekul MHC kelas II dalam mensekresi sitokin seperti IL-12, yang selanjutnya meningkatkan diferensiasi Th1. Sekresi IFN- γ juga menginduksi *class-switching* sel B ke IgG, yang mendukung fagositosis dan fiksasi komplemen. Akhirnya, sekresi IFN- γ *class-switching* meningkatkan diferensiasi sel T sitotoksik sepenuhnya dari prekursor CD8+ dengan mengaktifkan sel-sel dendritik yang terlibat dengan sel T naif. Efek gabungan ini membuat subset Th1 sangat cocok untuk menanggapi infeksi virus dan patogen intraseluler lainnya (Michel and Jäger, 2018; Schwartz, 2019).

Sel-sel Th2 berfungsi dalam menangani infeksi parasit ekstraseluler, termasuk *helminthes* dan parasit-parasit ekstraseluler lain, atau bersifat merusak dan menyebabkan terjadinya asma dan alergi-alergi terhadap bahan-bahan di lingkungan.

Sel Th2 memiliki peran penting dalam memperbesar dan memelihara peradangan yang ditandai dengan perekrutan eosinofil dan aktivasi sel mast. Diferensiasi Th2 diinduksi oleh IL-4, yang memicu jalur sinyal peningkatan regulasi dari ekspresi GATA-3. GATA-3 kemudian men-transaktivasi banyak sitokin-sitokin spesifik-Th2, terutama IL-4, IL-5, dan IL-13, yang semuanya *share* lokus genetik bersama. IL-4 juga menginduksi diferensiasi, aktivasi, dan migrasi dari eosinofil dan meningkatkan aktifitas

Sel B, serta menstimulasi IgE *class-switching*. IL-5 juga menginduksi sel B *class-*

switching ke sub kelas IgG yang tidak mengaktifkan jalur komplemen, dan IL-13 juga hampir tumpang tindih dengan IL-4 (Schwartz, 2019).



Gambar 2.10 Pembentukan dan fungsi subset-subset Th

Sel-sel T CD4+ Naive mampu berdiferensiasi menjadi berbagai subset efektor dan regulator. Pada gambar ditunjukkan subset-subset Th dengan sitokin-sitokin yang penting untuk diferensiasi, lineage-defining transcription factors, dan sitokin-sitokin efektor (Burkett *et al.*, 2019)

2.4 Sel T Helper 17 dan Interleukin 17

Sel CD4+ T-helper (Th) memainkan peran sentral dalam memulai dan mempertahankan respons imun yang beragam. Berbeda secara fungsional sel Th diinduksi ketika sel T naive distimulasi. Keterlibatan reseptor sel T dalam hubungannya dengan kostimulatori molekuler dan sitokin yang diproduksi oleh sel imun bawaan. Secara klasik, sel Th1 mengatur imunitas seluler melalui produksi interferon (IFN) - γ , sedangkan sel Th2 mengatur kekebalan humoral melalui produksi interleukin (IL) -4, IL- 5, dan IL-13. Sel T regulator (Treg), subset ketiga sel T CD4+, mengatur aktivasi dan perluasan garis keturunan ini melalui ekspresi dari P3 dan/atau kapasitas



untuk menghasilkan sitokin seperti transformasi pertumbuhan faktor (TGF)- β , IL-10, dan IL-35. Baru-baru ini, identifikasi dari garis keturunan baru sel T helper, Th17, telah merusak paradigma lama tentang peran tiga lainnya garis keturunan (Th1, Th2, dan Treg) (Gambar 2.9). Membedakan dengan produksi IL-17 (juga disebut IL-17A), sel Th17 ini dikembangkan dari sel T naïve CD4⁺ di bawah pengaruh jaringan sitokin inflamasi, termasuk IL-1, IL-6, dan TGF- β , yang mendukung komitmen terhadap silsilah ini. Meskipun IL-23 sebelumnya dilaporkan diperlukan untuk diferensiasi Th17, saat ini diperkirakan bahwa IL-23 memainkan sebuah peran penting dalam kelangsungan hidup dan perluasan patologis sel Th17 (Qu, *et al.*, 2013)

Sel Th17 pertama kali dikenali oleh karena dari pengekspresian IL-17A, namun juga mereka telah mengekspresikan secara istimewa IL-22, serta IL-17F, IL-21, GM-CSF, dan berpotensi TNF- α dan IL-6. Bagaimanapun juga, menjadi jelas bahwa profil ekspresi IL-22 berbeda dengan IL-17A. Sedangkan TGF- β dan IL-6 keduanya diperlukan untuk induksi IL-17A, IL-22 dapat diinduksi melalui IL-6 saja, dan meningkatkan jumlahnya dari TGF- β sebenarnya menghambat ekspresi IL-22. Kumpulan data menunjukkan bahwa sel Th17 memainkan peran yang signifikan dalam penyakit menular, kondisi autoimun, respon imun adopsi, dan imunitas mukosa.

Polarisasi sel Th17 sangat bergantung pada aksi sitokin (misalnya, IL-23) yang disekresikan oleh sel penyaji antigen (APC). Selain penyakit radang, IL-23 juga memainkan peran penting selama tumorigenesis. Berdasarkan bukti bahwa sel Th17 dapat memediasi inflamasi dan kerusakan jaringan, telah terjadi secara intens minat dalam mendefinisikan asal-usul dan fungsinya dan berkembang strategi untuk memblokir efek patologisnya (Qu, *et al.*, 2013)



IL-17 adalah salah satu sitokin yang paling banyak dipelajari dalam imunologi, setidaknya sebagian karena keterlibatannya dalam patologi inflamasi. Gen pengkode

IL-17 diklon pada tahun 1993 dari perpustakaan cDNA hibridoma limfosit T sitotoksik tikus dan peran IL-17 manusia dalam inflamasi dikenali segera setelahnya. Namun,

IL-17 menjadi sorotan perhatian imunologis setelah penemuan subset Th CD4+ yang berbeda secara perkembangan yang mengekspresikan IL-17 (yang disebut garis keturunan Th17) dan memediasi peradangan jaringan. Interleukin-17 atau IL-17A adalah anggota pendiri famili sitokin yang juga mencakup IL-17B hingga IL-17F.

Sumber seluler IL-17C cukup unik di antara isoform lainnya karena IL-17C diproduksi terutama oleh sel epitel daripada sel hematopoietik. Sitokin dengan karakteristik

terbaik dalam famili adalah IL-17 dan IL-17F, yang dapat memberi sinyal sebagai homodimer atau sebagai heterodimer IL-17A / F melalui reseptor heterodimer yang

sama yang terdiri dari subunit IL-17RA dan IL-17RC (gambar 2.9). IL-17RA diekspresikan di mana-mana pada berbagai tipe sel seperti halnya IL-17RC, meskipun

profil ekspresi jaringannya menunjukkan perbedaan yang menarik. IL-17RC sebagian besar diekspresikan dalam sel epitel prostat, ginjal dan sendi, sedangkan IL-17RA

banyak diekspresikan dalam kompartemen sel hematopoietik. Jika repertoar pengikatan IL-17RA dan IL-17RC mencakup ligan yang berbeda, ini akan

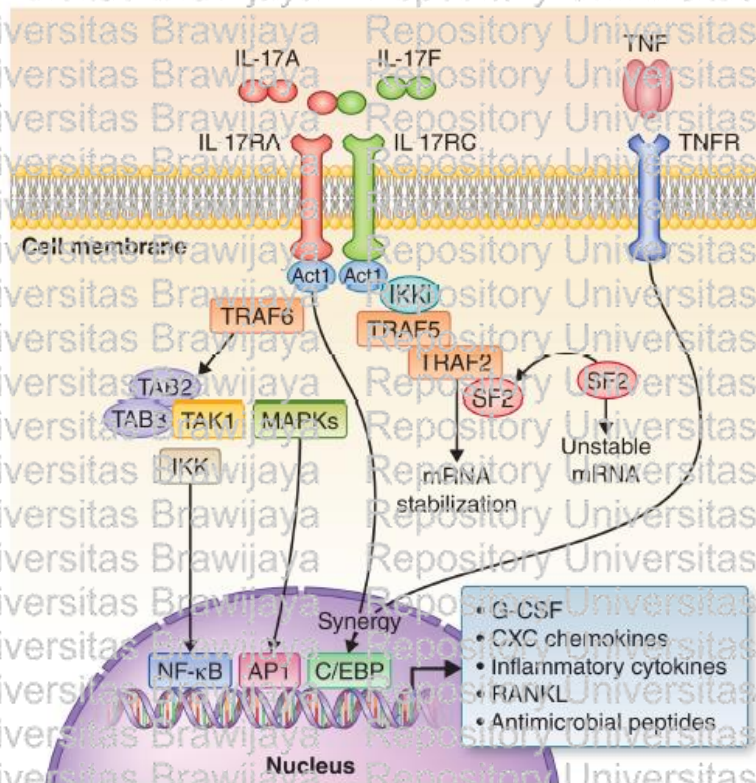
menjelaskan, setidaknya sebagian, distribusi jaringan mereka yang berbeda. Dalam hal ini, IL-17RA juga mengalami oligomerisasi dengan IL-17RB dan kompleks IL-17RA

/ RB mengikat IL-17E, juga dikenal sebagai IL-25 (jaringan yang responsif terhadap IL-25 mungkin mengekspresikan tingkat IL-17RA yang lebih tinggi dari IL-17RC). IL-

17RA juga berpasangan dengan IL-17RD, meskipun ligan serumpun (jika ada) untuk



kompleks IL-17RA / RD belum diidentifikasi. Distribusi jaringan yang berbeda dari IL-17RA dan IL-17RC juga dapat berfungsi untuk memungkinkan pensinyalan spesifik jaringan oleh IL-17A, IL-17F, dan IL-17A / F, karena ligan ini memiliki afinitas pengikatan yang berbeda untuk masing-masing IL-17RC dan IL-17RA subunit, meskipun IL-17A secara keseluruhan mengikat IL-17RA / RC kompleks, dengan afinitas yang lebih tinggi dari IL-17F. Menariknya, IL-17B dan IL-17C dapat memberi sinyal melalui reseptor monomerik, IL-17RB dan IL-17RE, masing-masing, sedangkan reseptor untuk IL-17D tidak diketahui (Zenobia and Hajishengalis, 2015)



Gambar 2.11 Pensinyalan reseptor interleukin 17

Meskipun merupakan sitokin khas sel Th17, IL-17 sekarang diketahui diekspresikan juga oleh jenis sel adaptif dan kekebalan lainnya, termasuk sel T CD8



+ sel T $\gamma\delta$, sel T_{NK} (NKT), dan sel limfoid bawaan (gambar 2.10). Sel T $\gamma\delta$ merupakan subset sel limfoid yang relatif kecil dalam jaringan limfoid dan darah tetapi mereka merupakan subset utama di situs mukosa, di mana mereka dapat dipicu untuk memproduksi IL-17 oleh sinyal bawaan, seperti IL-1 dan IL-23, tanpa keterlibatan reseptor sel-T. IL-17 juga ditunjukkan diekspresikan oleh neutrofil tikus dan, baru-baru ini, populasi neutrofil manusia diidentifikasi yang mengekspresikan faktor transkripsi ROR γ t dan keduanya menghasilkan dan menanggapi IL-17. Konsisten dengan tingkat plastisitas bawaan tertentu, sel T naif, sel T memori, dan sel T regulasi (Treg) CD4 + Foxp3 + semuanya telah terbukti memiliki kemampuan untuk berdiferensiasi menjadi fenotipe penghasil IL-17. Sel T penghasil IL-17 yang dihasilkan dapat mengekspresikan berbagai konsentrasi efektor yang berbeda seperti IL-17 dan IL-10, yang berpotensi menunjukkan fenotipe patogen atau regulasi (Zenobia and Hajishengallis, 2015)



konsisten dengan laporan sebelumnya. Yang penting, bahwa proporsi sel Th17 dan IL-17 adalah berkorelasi erat dengan aktivitas penyakit AIHA. Sebaliknya, tidak ditemukan korelasi yang signifikan antara serological Interferon (IFN)- γ dan aktivitas penyakit di pasien AIHA. Temuan ini konsisten dengan sebuah penelitian terbaru yang menunjukkan bahwa produksi IL-17 lebih tepatnya dibandingkan IFN- γ , lebih kuat terkait dengan anemia hemolitik autoimun, dan menyarankan bahwa sel Th17 mungkin menjadi kritis dalam pengembangan AIHA. Bukti terbaru menunjukkan bahwa IL-6 dan IL-21 adalah efektor penting dalam mempromosikan pembentukan sel Th17. Temuan ini menyatakan bahwa kadar serologis IL-6 dan IL-21 secara bermakna lebih tinggi pada pasien dengan AIHA dibandingkan dengan kontrol yang sehat. Peningkatan tingkat IL-6 dan IL-21 mungkin terjadi dikaitkan dengan peningkatan proporsi sel Th17 pada pasien AIHA. Namun, mekanisme tepat yang mendasari peningkatan proporsi sel Th17 tetap membutuhkan penelitian selanjutnya. IL-17 adalah sitokin dari sel Th17 dan efektor kunci untuk sel Th17 untuk menggunakan fungsinya aktivitas dalam penyakit inflamasi dan autoimun. Serologis IL-17 juga secara signifikan lebih tinggi pada pasien dengan AIHA dan berkorelasi dengan aktivitas penyakit. Untuk mengkonfirmasi lebih lanjut peran potensial sel Th17 dan mengeksplorasi kemungkinan mekanismenya dalam pengembangan AIHA, telah dilakukan adopsi percobaan transfer dan uji netralisasi menggunakan model AIHA. Ditemukan transfer adopsi itu sel Th17 secara efektif dapat meningkatkan perkembangan dari AIHA, sedangkan blokade in vivo IL-17 bisa secara signifikan membatalkan efek sel Th17 pada yang diinduksi AIHA. Juga ditemukan bahwa blokade IL-17 pada model tikus yang tidak ditransfer dapat secara signifikan



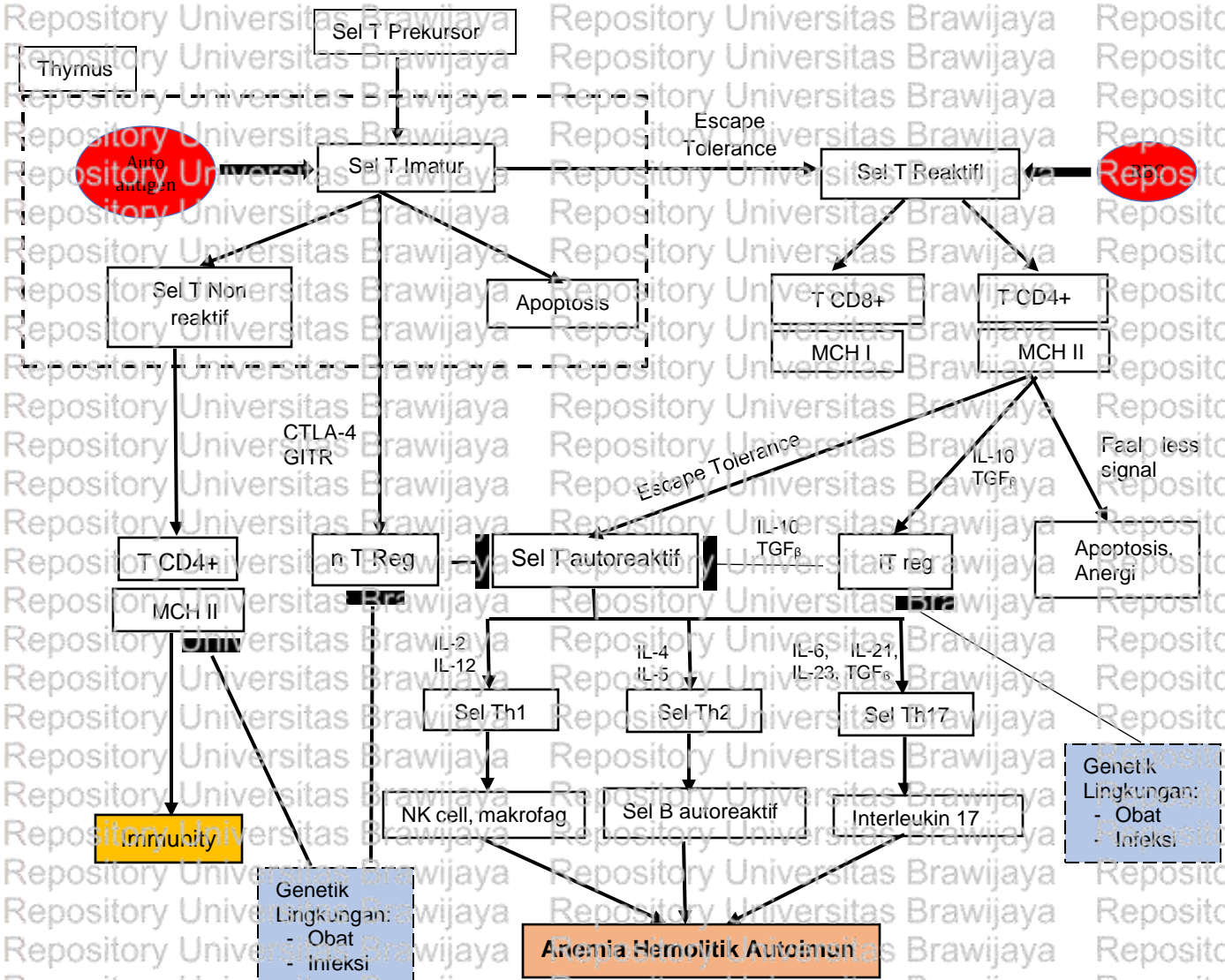
mengurangi kejadian tersebut dari AIHA disertai dengan tingkat keparahan yang relatif lebih lemah aktivitas penyakit. Akhirnya, dikonfirmasi peran IL-17 dalam pengembangan AIHA menggunakan IL-17 tikus. Selain itu, tidak ditemukan korelasi yang signifikan antara IFN- γ serum dan tingkat anti-RBC antibodi, atau serum C3 pada pasien AIHA, dan mengungkapkan bahwa frekuensi IFN- γ +CD4⁺ sel T pada splenosit menciit yang diimunisasi sekitar 2,7%. Yang penting, telah ditemukan bahwa level Anti-RBC IgG autoantibody dan anti-rat RBC IgG antibody dalam kelompok sel-ditransfer Th17 lebih tinggi dari mereka yang berada dalam kelompok transfer sel Th1. Jika digabungkan, data kami sangat menunjukkan sel Th17 itu sangat penting untuk pengembangan AIHA secara dominan melalui IL-17. Mengenai kemungkinan mekanisme yang mendasari, bukti terbaru menunjukkan bahwa sel Th17 dapat berfungsi sebagai sel B helper. Sensitisasi sel T spesifik antigen ditemukan rusak pada tikus yang kekurangan IL-17, menyebabkan penekanan respons seluler dan humoral alergi. Sejalan dengan temuan tersebut, kami juga menemukan adanya gangguan respon antibodi terhadap antigen RBC tikus di IL-17 tikus. Data ini menunjukkan bahwa sel Th17 dan IL-17 memainkan peran penting dalam mendorong peningkatan produksi antibodi melawan sel darah merah tikus, yang pada gilirannya bertanggung jawab atas gangguan induksi AIHA (Xu, *et al.*, 2012).



BAB 3

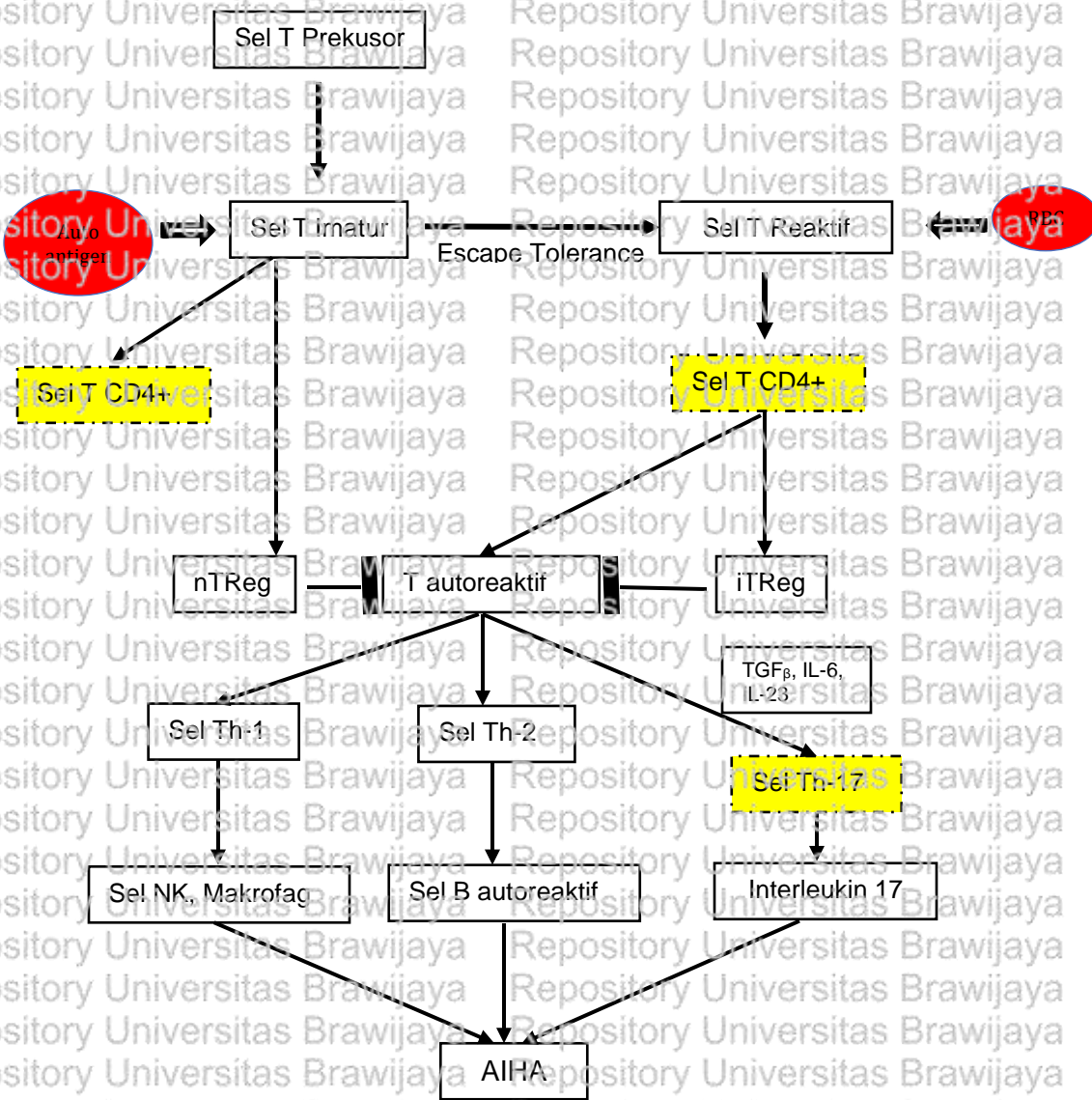
KERANGKA TEORI, KONSEP DAN HIPOTESIS

3.1 Kerangka Teori



Gambar 3.1 Kerangka Teori

3.2 Kerangka Konsep



keterangan:

Yellow box : variable yang diteliti

T-bar : menghambat

Gambar 3.2 Kerangka Konsep



Kerusakan toleransi imunologis dan perkembangan penyakit autoimun adalah proses yang kompleks. Studi AIHA pada manusia dan hewan coba tikus telah menyatakan adanya defek dalam presentasi autoantigen oleh sel dendritik, serta kelainan fungsional limfosit B dan T. Pengenalan yang kuat terhadap autoantigen oleh sel T imatur di timus dapat menyebabkan kematian sel tersebut (seleksi negative atau delesi), atau berkembang sel T regulator yang memasuki jaringan perifer. *Antigen presenting cell*, termasuk sel dendritik dan makrofag, menangkap autoantigen dari sel lain dan mempresentasikannya ke sel T autoreaktif untuk menginduksi toleransi sel T baik oleh penghapusan dan apoptosis atau anergi. Pada pasien dengan AIHA, sel T autoreaktif lolos dari seleksi timus dan tetap berada di perifer. Telah ditunjukkan bahwa sel-sel ini kemudian dapat diaktifkan secara *in vivo* pada pasien dengan AIHA, tetapi tidak pada kontrol sehat.

Aktivasi poliklonal sel B oleh superantigen atau mitogen telah diusulkan sebagai mekanisme yang mungkin oleh virus mana yang memicu penyakit autoimun. Pada penelitian dengan hewan coba, inokulasi intraserebral virus koriomeningitis limfositik, tikus CH3cB/FeJ mengembangkan AIHA dan hipergammaglobulinemia. Pada manusia, beberapa infeksi virus dan parasit diikuti oleh peningkatan produksi auto-antibodi dan AIHA. Pada penyakit kronik graft-versus-host, aktivasi sel B inang oleh sel T donor menginduksi autoimun, termasuk AIHA tipe hangat.

Meskipun AIHA disebabkan oleh antibodi anti-RBC yang diproduksi oleh limfosit B, produksi auto-antibodi adalah proses yang tergantung pada sel T. Pada penelitian yang dilakukan dengan hewan coba tikus nitam Selandia Baru, di mana pengobatan dengan monoklonal antibody anti-CD4 menurunkan produksi



autoantibodi IgG. Deplesi sel T dari tikus tersebut mencegah induksi AIHA dalam respon imunisasi oleh sel darah merah tikus.

Dogma saat ini menunjukkan bahwa penyakit autoimun ditandai dengan ketidakseimbangan antara pro-inflamasi dan mekanisme anti-inflamasi. Yang baru-baru ini diketahui Interleukin 17 diproduksi oleh pro-inflamasi sel Th17. Di sisi lain, sel T regulator (Treg) ditandai dengan CD4+CD25hi Fox3+ memiliki peran penting dalam mempertahankan toleransi diri. Telah disarankan bahwa sel Treg melawan sel Th17 dan mengurangi potensi autoimun. Baik penurunan sel Treg maupun peningkatan sel Th17 telah didokumentasikan dalam AIHA.

Peneliti ingin meneliti kadar sel T CD4+ dan sel Th17 pada pasien AIHA dibandingkan normal, sehingga bisa lebih mendalami faktor penyebab terjadinya autoimunitas.

3.3 Hipotesis:

1. terdapat persentase sel T CD4+ yang lebih rendah pada pasien AIHA dibandingkan subjek normal
2. terdapat persentase sel Th17 yang lebih tinggi pada pasien dengan AIHA dibandingkan subjek normal



BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan desain observasional *case control* di laboratorium secara *in vitro* dengan *Randomized Post Test Only Controlled Group Design* pada kultur *peripheral blood mononuclear cell* (PBMC) pada kelompok sampel pasien AIHA dan kontrol normal. Pada penelitian ini akan dievaluasi jumlah sel T CD4+ dan subsetnya berupa sel Th 17.

4.2 Populasi dan Subyek penelitian

Populasi kelompok pasien adalah pasien AIHA yang datang ke RS. Sedangkan subyek penelitian adalah dari pasien yang telah didiagnosis AIHA yang datang ke RSUD dr. Saiful Anwar Malang. Diagnosisnya didasarkan klinis oleh dokter ahli Ilmu Penyakit Dalam dan Laboratoris. Kontrol sehat adalah subyek dengan umur dan jenis kelamin yang sesuai. *Informed consent* tertulis diperoleh baik dari pasien maupun kontrol.

Subyek yang terlibat dalam penelitian dilakukan anamnesis, pemeriksaan fisik diagnostik, pemeriksaan laboratorium darah lengkap, urine lengkap, kimia darah, dan analisis flow sitometri sel T CD4+ dan sel Th17 kultur PBMC pasien AIHA dan normal



4.3. Kriteria Inklusi dan eksklusi subyek penelitian

4.3.1 Kriteria inklusi:

1. Usia antara 18- 65 tahun
2. Memenuhi kriteria diagnosis AIHA seperti yang ditetapkan
3. Bersedia ikut dalam penelitian dan menandatangani *informed consent*

4.3.2 Kriteria Eksklusi

1. Merokok, infeksi akut, vaksinasi kurang dari 3 bulan yang lalu, terapi kanker kurang dari 5 tahun yang lalu, diagnostic X rays kurang dari 3 bulan yang lalu, alergi akut, *vegan nutrition* dan *alcohol abuse*.
2. Subyek menolak untuk ikut serta dalam penelitian
3. AIHA sekunder (AIHA yang disebabkan oleh penyakit autoimun yang lain seperti LES, *Evans syndrome*)

4.4 Sampel

Sampel darah dari pasien AIHA yang memenuhi kriteria diagnosis berikut: hemoglobin (Hb) turun, aktifitas *lactate dehydrogenase* (LDH) > 480 U/L, kadar bilirubin serum >1,0 mg/dL, retikulositosis (> 2,5%), dan DAT positif. Pada semua kasus dilakukan pemeriksaan *direct antiglobulin test* (DAT)/*direct Coombs test* dengan polyspecific DiaMed Micro Typing ID gel system (DiaMed, Cressier sur Morat, Switzerland).

Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah *peripheral blood mononuclear cell* (PBMC) yang diisolasi dari *whole blood*-Heparin kedua kelompok subyek, kemudian masing-masing dilakukan kultur selama 48 jam.



Besar sampel yang digunakan pada penelitian ini dihitung dengan rumus:

Penelitian ini merupakan penelitian komparatif numerik tidak berpasangan. Jumlah sampel dihitung dengan rumus :

$$n_1 = n_2 = 2 \left(\frac{[Z_\alpha + Z_\beta] S}{x_1 - x_2} \right)^2$$

n = jumlah sampel tiap perlakuan

Z_α = deviasi baku dari kesalahan tipe 1

Z_β = deviasi baku dari kesalahan tipe 2

S = simpang baku selisih rerata

$x_1 - x_2$ = perbedaan rerata minimal yang dianggap bermakna

Setelah dilakukan perhitungan dengan menggunakan α sebesar 5% dan β sebesar 20%, didapatkan Z_α sebesar 1,64 untuk hipotesis satu arah, dan Z_β sebesar 0,84. Berdasarkan referensi penelitian sebelumnya, didapatkan nilai S sebesar 10%, dan $x_1 - x_2$ sebesar 10%. Dari hasil perhitungan didapatkan besar sampel yang akan digunakan pada penelitian ini adalah 12 untuk masing-masing kelompok eksperimen.

Cara Pengambilan sampel: sampel diperoleh secara konsekutif pada kontrol sehat dan pasien yang memenuhi kriteria inklusi-eksklusi di Poliklinik Ilmu Penyakit

Dalam (IPD) divisi Hematologi Onkologik Medik, Instalasi Laboratorium Sentral RSUD

Dr. Saiful Anwar Malang, Laboratorium Biomedik dan Laboratorium Parasitologi FK

Universitas Brawijaya Malang.



4.5 Variabel Penelitian

Dalam penelitian ini terdapat dua macam variabel yaitu variabel bebas dan variabel tergantung. Variabel bebas (*independent variable*) adalah AIHA. Sedangkan variabel tergantung (*dependent variable*) adalah sel-sel T CD4+ dan Th17

4.6. Definisi Operasional

- Pasien *Autoimmune hemolytic anemia* (AIHA) adalah pasien dengan penyakit yang disebabkan oleh autoantibodi terhadap beberapa antigen yang diekspresikan pada permukaan eritrosit. Diagnosis AIHA ditegakkan berdasarkan gambaran klinis dan laboratoris, yaitu, anemia, aktifitas *lactate dehydrogenase* (LDH) > 480 U/L, kadar bilirubin serum >1,0 mg/dL, retikulositosis (> 2,5%), dan DAT positif
- *Direct Antiglobulin Test* (DAT) adalah prosedur laboratorium imunologi yang digunakan untuk mendeteksi keberadaan antibodi terhadap sel darah merah (RBC) yang bersirkulasi dalam tubuh, yang kemudian menginduksi hemolisis. Prinsip DAT adalah untuk mendeteksi keberadaan antibodi yang menempel langsung ke sel darah merah, yang dilakukan dengan mencuci sampel darah yang dikumpulkan dalam saline untuk mengisolasi sel darah merah pasien; prosedur ini menghilangkan antibodi yang tidak terikat yang dapat mengacaukan hasil.
- Kultur *Peripheral blood mononuclear cell* (PBMC) adalah kultur sel darah tepi manusia di mana hanya sel yang mempunyai nukleus tunggal saja (limfosit, monosit) yang diisolasi. Dikultur pada kondisi tertentu dan



dipanen pada saat tertentu. PBMC diperoleh dari whole blood pasien AIHA dan kontrol normal, dengan satuan sel/ul.

- Sel T CD4⁺ adalah kompleks protein antibodi monoklonal pada permukaan limfosit yang terdiri dari empat rantai yang berbeda, yang pada umumnya, kompleks CD3⁺ terdiri dari rantai CD3 γ , rantai CD3 δ , dan dua rantai CD3 ϵ . Pada penelitian ini sel-sel T CD4⁺ berasal dari kultur PBMC pasien AIHA dan kontrol normal, yang diukur persentasenya dengan flow sitometri *facs melody*

- Sel T Helper 17 merupakan salah satu subunit sel T CD4⁺ yang menghasilkan interleukin *proinflammatory*, yaitu interleukin 17 yang dikaitkan dengan banyak penyakit peradangan seperti *rheumatoid arthritis*, asma, lupus eritematosus sistemik (LES), dan *allograft rejection*. Pada penelitian ini sel Th17 diperiksa dengan flow sitometri *facs melody*, yang berasal dari kultur PBMC pasien AIHA dan kontrol normal

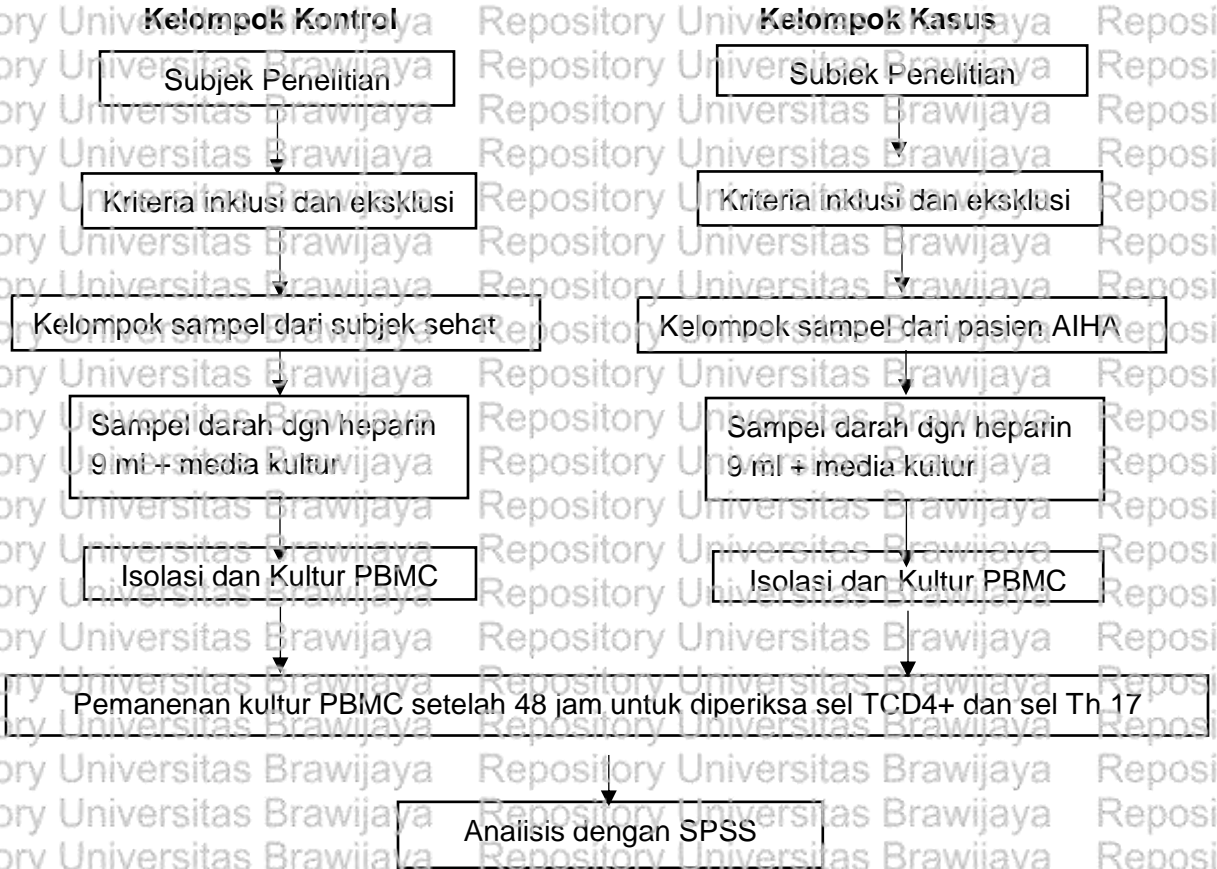
4.7 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di tiga laboratorium yaitu di instalasi Laboratorium Sentral RSSA untuk pengambilan sampel darah dan urine, dan Laboratorium Parasitologi FKUB untuk isolasi, kultur dan pemanenan PBMC. Uji ekspresi sel TCD4⁺, dan sel Th-17 dengan flow sitometri *facs melody* dilakukan di Laboratorium Biomedik FKUB.

Waktu penelitian ini dilaksanakan mulai pada bulan April 2018 – Agustus 2021



4.8 Alur Penelitian



Gambar 4.1 Alur Penelitian

4.9 Bahan dan Alat

4.9.1 Isolasi PBMC

A. Alat

1. Tabung sentrifus 15 ml
2. *Micropipette*
3. *Swing centrifuge*

B. Bahan



1. *Ficoll-Hipaque* $d=1.077$ g/mL

2. *Phosphat Buffer Saline* (PBS)

3. Sampel darah ± 9 ml yang dimasukkan dalam *vacutainer* heparin

4.9.2 Kultur PBMC

1. Kultur PBMC kedua kelompok sampel
2. *Well plate*
3. Inkubator

4.9.3 Flow sitometri

Facs Melody (BD flow cytometer)

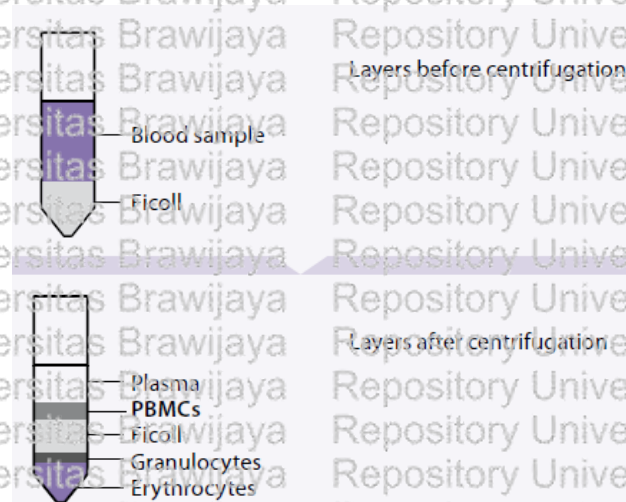
4.10 Prosedur Penelitian

4.10.1 Isolasi PBMC

1. Semua bahan yang diperlukan dikeluarkan dari lemari pendingin dan dibiarkan sampai suhu ruang.
2. Disiapkan tabung *sentrifus* 15 ml dan diisi dengan *Ficoll-Hipaque* $d=1.077$ g/mL
3. Sampel darah dalam *vacutainer* heparin yang akan diuji dibolak-balik perlahan agar homogen kemudian dicampur 1:1 dengan PBS. Kemudian diambil dengan *micropipette* dan disalurkan secara perlahan pada dinding tabung yang sudah diisi *Ficoll-Hipaque* $d=1.077$ g/mL. Perbandingan volume antara *Ficoll-Hipaque* dengan sampel darah adalah 1:1. Akan terbentuk 2 lapisan.



4. Kemudian disentrifus suhu ruang dengan kecepatan 1000 rpm selama 30 menit.
5. Setelah disentrifus akan terpisah menjadi 5 lapisan, yaitu plasma, PBMC, *Ficoll-Hipaque*, granulosit dan eritrosit.



Gambar 4. 2 Isolasi PBMC

6. Cincin PBMC yang terbentuk diambil secara perlahan menggunakan *micropipette* dan diletakkan dalam tabung sentrifus 15 ml yang baru.
7. Larutan PBMC kemudian dicuci dengan PBS 10 ml dan disentrifus suhu ruang dengan kecepatan 1200 rpm selama 10 menit.
8. Kontaminasi eritrosit ditambahkan *RBC lysis buffer*.
9. Supernatan dibuang dan pelet yang terbentuk dicuci kembali dengan PBS dan disentrifus kembali pada suhu ruang 1200 rpm (1000 – 1600 rpm) selama 10 menit, dilakukan dua kali.
10. Setelah disentrifus maka akan terbentuk *pellet* (sel PBMC) pada dasar tabung sentrifus 15 ml.



4.10.2 Kultur PBMC dari pasien AIHA dan kontrol sehat

A. Bahan:

1. Golgi Plug
2. RPMI 1640 with L-Glutamine
3. FBS
4. Penicillin Streptomycin Culture Grade
5. Hepes
6. Natrium Bicarbonat culture grade

B. Kultur PBMC:

- Sebanyak 10^5 - 10^6 PBMC disuspensikan dalam 300 μ L medium kultur

RPMi untuk masing-masing sampel PBMC. Dibagi menjadi 2 kelompok:

1. PBMC kelompok pasien AIHA
2. PBMC kelompok subjek normal

PBMC dikultur selama 48 jam dalam *tissue culture well* dalam inkubator

37°C 5% CO_2 .

Medium kultur:

1. RPMI 1640
2. Natrium bicarbonat 0.2%
3. *Buffer Hepes* 0.28%
4. *Penstrep* 0.25%
5. PBS 10%



Pada hari ke 3 dipanen, 5-6 jam sebelum dipanen diberikan Brefeldin A (Golgiplug) dosis 10 µg/ml. Tujuan pemberian Golgiplug agar sitokin tidak disekresi terlalu banyak oleh sel ke dalam supernatan. Sel diambil dengan *micropipete* dan dimasukkan ke dalam tabung *ependorf* 1,5 ml dan disentrifus 2500 rpm selama 3 menit.

Pellet yang terbentuk dicuci dengan 1 ml PBS, dicuci 2-3 kali.

Siap untuk dilakukan pengecatan untuk pemeriksaan flow sitometri.

4.10.3 Flow sitometri

A. Bahan:

1. PerCP anti human CD3+
2. APC anti human CD4+
3. Cell Staining Buffer
4. Fixation Buffer
5. Permeable Wash Buffer

B. Alat:

1. Tabung *ependorf* 1,5 ml
2. Sentrifus dingin
3. Micropipette
4. Tabung sentrifus 50 ml
5. Tabung sentrifus 15 ml
6. Tabung sentrifus 1,5 ml
7. Blue tip
8. Yellow tip



9. White tip

10. TC Well 96

11. Disposable syringe filter 0.45 μm

12. Disposable syringe filter 0.2 μm

13. Disposable spuit 10 ml

14. Disposable pipet 5 ml

4.10.3.1 Pengecatan dengan cell surface marker CD

Cara Kerja:

- Pellet PBMC ditambahkan dengan *cell staining buffer*, dan dibagi dalam beberapa *ependorf* sesuai dengan banyaknya perlakuan. *Cell staining buffer* merupakan larutan yang dibuat dari 2% *Fetal Bovine Serum* (FBS) dalam PBS.
- Pellet siap untuk distaining dengan antibodi *cell surface marker* anti human CD4 berlabel *fluorochrome* FITC (yang telah diencerkan dengan *cell staining buffer* dengan perbandingan 1:100)
- Antibodi yang telah diencerkan kemudian diambil sebanyak 50 μl dan dicampurkan dengan *pellet* PBMC dan dihomogenkan.
- *Pellet* yang telah diberi antibodi diinkubasi selama 20 menit dalam gelap di suhu ruang.
- Setelah inkubasi ditambahkan *cell staining buffer* sesuai dengan kebutuhan, dihomogenkan
- Kemudian dipindahkan ke kuvet baca dan siap untuk dibaca dengan *flow sitometri*.



4.10.3.2 Pengecatan Intracellular (cytoplasmic) marker/antibodi anti sitokin

Cara Kerja:

- *Pellet* yang telah diinkubasi dengan antibodi *cell surface marker* kemudian dicuci dengan 500 μ l *cell staining buffer*, disentrifus pada suhu 4°C dengan kecepatan 2500 rpm selama 3 menit.
- Supernatan dibuang, kemudian *pellet* yang terbentuk dicuci dengan 500 μ l larutan *fix buffer*, dinomogenkan dan disentrifus pada suhu 4°C dengan kecepatan 2500 rpm selama 3 menit.
- Supernatan dibuang, kemudian *pellet* difiksasi dengan 500 μ l *fix buifer* lalu diinkubasi selama 20 menit dalam gelap di suhu ruang.
- Setelah inkubasi selesai, larutan disentrifus pada suhu 4°C dengan kecepatan 2500 rpm selama 3 menit.
- Supernatan dibuang, *pellet* yang terbentuk dicuci dengan larutan *permeable wash buffer* disentrifus pada suhu 4°C dengan kecepatan 2500 rpm selama 3 menit. Larutan *perm wash buffer* tersedia dalam 10x konsentrasi, jadi apabila akan digunakan harus diencerkan terlebih dahulu dengan *deionized water*.
- Supernatan dibuang, kemudian *pellet* siap untuk dilakukan pengecatan dengan antibodi intraseluler sitokin (yang telah diencerkan dalam *permeable wash buffer* dengan perbandingan tertentu).
- Masing-masing larutan dilakukan pengecatan dengan 50 μ l antibodi yang telah diencerkan, kemudian diinkubasi dalam gelap di suhu ruang selama 20 menit.



- Setelah diinkubasi dicuci dengan menambahkan 500 μ l larutan *perm wash buffer* dan disentrifus pada suhu 4°C dengan kecepatan 2500 rpm selama 3 menit.
- Supernatan dibuang dan ditambahkan 350 μ l *cell staining buffer*, dihomogenkan.
- *Pellet* dipindahkan ke kuvet baca dan siap untuk dibaca ekspresi sitokin dengan flow sitometri. Ekspresi sitokin dinyatakan dalam satuan persen (%). Analisis sampel dilakukan dengan FACS Melody flow sitometer (Becton Dickinson, San Jose, California, USA). FACS-*acquisition* dan analisis dilakukan dengan FACS *Cell Quest software* (BD Biosciences). Pertamakali sampel dilakukan pemeriksaan jumlah sel-sel T CD4+. Persentase sel-sel T CD4+ dan sel Th17 dalam populasi sel T CD4+ total kemudian ditentukan.

4.11 Pengumpulan dan Analisis Data

Data hasil penelitian dihitung untuk mendapatkan rerata dan standard error of mean. Perbedaan antar kelompok dianalisis dengan independent t-Test atau Mann Whitney tergantung distribusi data yang diperoleh, dengan tingkat kebermaknaan $p < 0,05$.



BAB V

HASIL PENELITIAN

5.1 Karakteristik Subjek Penelitian

Dari penelitian didapatkan subjek penelitian sebanyak 24 orang, terdiri dari 12 pasien AIHA dan 12 orang sebagai kontrol normal.

Tabel 5.1 Perbandingan data klinis dan laboratorium pasien AIHA dan subjek normal

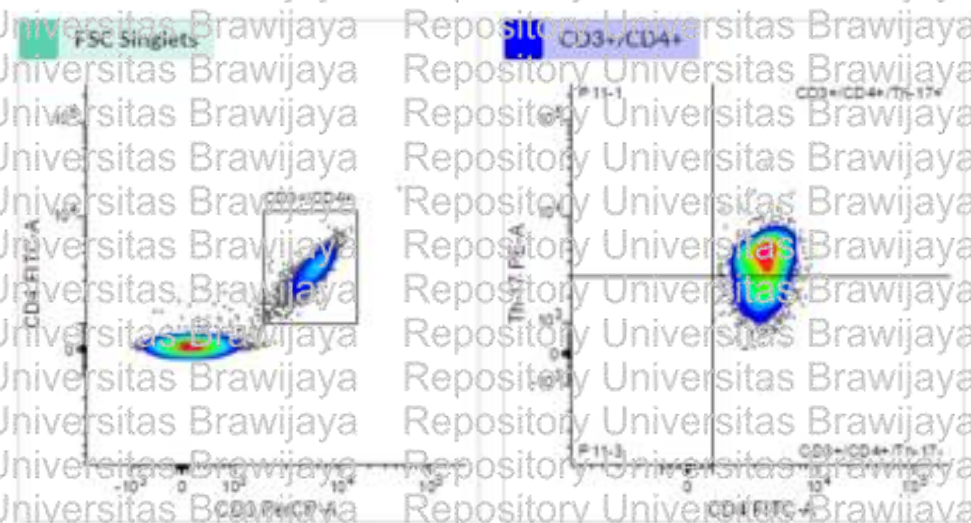
No	Data	Pasien AIHA	Subjek normal	Nilai p
1	Usia	31,5 ± 8,46	25,25 ± 5,53	0,045
2	Ratio L:P	1:5	1,4:1	0,035
3	Hemoglobin (g/dL)			
	Laki-laki	10,35 ± 0,35	16,7 ± 1,271	0,02
	Perempuan	10,05 ± 1,01	12,44 ± 1,11	0,001
4	Hematokrit (%)	29,04 ± 2,85	43,84 ± 5,76	0,000
5	RDW	15,34 ± 1,78	12,88 ± 1,007	0,000
6	Leukosit (sel/mm ³)	4830 ± 2064,76	5838,33 ± 1159	0,41
7	Trombosit (sel/mm ³)	167.333 ± 90.324	241.500 ± 69.783	0,035

Dari tabel didapatkan rata-rata usia pasien AIHA sebagai subjek penelitian yaitu 31,5 dan rata-rata usia subjek normal 25,25 tahun. Rasio jenis kelamin laki-laki dibanding perempuan pada pasien AIHA 1:5. Dari pemeriksaan laboratorium didapatkan hasil perbedaan yang bermakna pada kadar hemoglobin, hematokrit dan trombosit pasien AIHA dan subjek normal, dimana rata-rata kadar hemoglobin, hematokrit dan trombosit pasien AIHA lebih rendah dibandingkan subjek normal. Pada

pemeriksaan laboratorium RDW, rata-ratanya dijumpai lebih tinggi pada pasien AIHA dibandingkan subjek normal. Sedangkan pada nilai leukosit tidak terdapat perbedaan yang bermakna pada kedua kelompok penelitian.

5.2 Analisa statistik

Dari hasil penelitian didapatkan 12 kultur PBMC sampel populasi normal dan 12 kultur PBMC populasi AIHA yang selanjutnya dilakukan pengecatan dengan *cell surface marker CD* dan *intracellular (cytoplasmic) marker/* antibodi anti sitokin. Hasil akhir yang menjadi data pada penelitian ini didapatkan dari perhitungan parameter pada *scatter* tersebut, seperti yang tertera pada gambar sebagai berikut:



Gambar 5.1 Diagram Scatter salah satu pasien penelitian

Seluruh sampel dilakukan pembacaan pada diagram scatter dan didapatkan hasil persentase sel CD4+ dan Th17 sebagai berikut



Tabel 5.2 Hasil penelitian persentase sel T CD4+ dan sel Th17

Normal/ sehat	Sel T CD4+	Sel Th17	Pasien/sakit	Sel T CD4+	Sel Th17
S_01	31,24%	65,26%	P_01	26,58%	60,06%
S_02	27,00%	54,82%	P_02	25,42%	66,17%
S_03	26,17%	67,69%	P_03	24,93%	67,40%
S_04	27,54%	66,27%	P_04	26,12%	68,96%
S_05	26,80%	68,23%	P_05	25,77%	71,35%
S_06	27,38%	63,98%	P_06	26,09%	60,13%
S_07	31,12%	52,44%	P_07	26,42%	64,36%
S_08	30,93%	57,49%	P_08	25,66%	67,66%
S_09	31,53%	61,79%	P_09	27,28%	68,71%
S_10	32,12%	62,81%	P_10	26,54%	69,00%
S_11	27,00%	54,82%	P_11	26,58%	59,98%
S_12	32,12%	62,81%	P_12	26,58%	59,98%

5.2.1 Uji Normalitas

Uji normalitas data hasil penelitian dilakukan dengan uji *Saphiro-Wilk*. Uji normalitas dikatakan terpenuhi jika $p\text{-value} > 0,05$. Dengan menggunakan bantuan software SPSS didapatkan hasil uji normalitas sebagai berikut:

Tabel 5.3 Hasil Uji Normalitas

Variabel	Kelompok	Shapiro-Wilk	P-value	Keterangan
Sel T CD4+	Subyek Sehat	0.813	0.013	Tidak Normal
	Pasien AIHA	0.957	0.746	Normal
Sel Th17	Subyek Sehat	0.915	0.247	Normal
	Pasien AIHA	0.86	0.05	Normal

Dari tabel di atas dapat dilihat bahwa data variabel CD4+ terdistribusi tidak normal karena nilai $p\text{-value}$ pada subyek sehat $0,013 < 0,05$, sehingga analisis selanjutnya menggunakan analisis nonparametric (uji Mann Whiteny). Data variabel



Th17 terdistribusi normal karena nilai p-value $> 0,05$, sehingga analisis selanjutnya menggunakan analisis parametrik (uji t).

5.2.2 Uji Homogenitas

Pengujian asumsi homogenitas ragam dilakukan dengan menggunakan uji Levene. Asumsi homogenitas ragam dikatakan terpenuhi jika p-value hasil penghitungan lebih besar daripada $\alpha = 0,05$. Berikut hasil pengujian asumsi homogenitas ragam dengan menggunakan bantuan software SPSS :

5.4 Tabel Uji Homogenitas Ragam

Variabel	Koefisien	p-value	Keterangan
Sel T CD4+	104.279	0.000	Tidak Homogen
Sel Th17	0.704	0.410	Homogen

Berdasarkan tabel di atas, pada pengujian asumsi homogenitas ragam variabel menunjukkan bahwa asumsi homogenitas ragam variabel CD4+ tidak terpenuhi, sehingga analisis selanjutnya menggunakan analisis nonparametrik (uji Mann Whitney). Asumsi homogenitas ragam variabel Th17 terpenuhi, sehingga analisis selanjutnya menggunakan analisis parametrik (uji t).

5.2.3 Uji Beda (Uji t/Mann Whitney)

Sebagaimana telah dijelaskan dalam pengujian asumsi normalitas dan homogenitas ragam, asumsi normalitas dan homogenitas variabel sel Th17 terpenuhi dan pada variabel sel T CD4+ tidak terpenuhi. Selanjutnya dilakukan uji beda sel T



CD4+ dengan uji Mann-Whitney dan sel Th17 dengan uji t berdasarkan kelompok sehat dan pasien AIHA.

Tabel 5.5 Perbandingan Sel T CD4+ dan Th17 berdasarkan kelompok sehat dan pasien AIHA

No	Variabel	Kelompok	Mean ± SD	p-value	Keterangan
1	Sel T CD4+	Subyek Normal	0,292 ± 0,024	0,000	Berbeda Signifikan
		Pasien AIHA	0,261 ± 0,006		
2	Sel Th17	Subyek Normal	0,615 ± 0,053	0,072	Tidak Berbeda Signifikan
		Pasien AIHA	0,652 ± 0,042		

5.3 Perbandingan persentase Sel T CD4+

Berdasarkan pada hasil analisis perbedaan sel T CD4+ berdasarkan kelompok sehat dan pasien AIHA dengan menggunakan uji Mann-Whitney, didapatkan p-value lebih kecil daripada $\alpha = 0,05$ ($p < 0,05$), yakni 0,000. Sehingga dari pengujian ini dapat disimpulkan bahwa terdapat perbedaan yang signifikan rata-rata sel T CD4+ pada kelompok sehat dan pasien AIHA. Rata-rata sel T CD4+ pada pasien AIHA (0,261) lebih rendah daripada rata-rata sel CD4+ pada subjek normal (0,292).

Rata-rata nilai sel T CD4+ pada subjek normal dan pasien AIHA ditunjukkan dalam histogram berikut :



Gambar 5.2 Histogram rata-rata sel T CD4+

5.4 Perbandingan persentase sel Th 17

Berdasarkan pada hasil analisis perbedaan sel Th17 berdasarkan kelompok sehat dan pasien AIHA dengan menggunakan uji t, didapatkan p-value lebih besar daripada $\alpha = 0,05$ ($p > 0,05$), yakni 0,072. Sehingga dari pengujian ini dapat disimpulkan bahwa tidak terdapat perbedaan yang signifikan rata-rata sel Th 17 pada kelompok sehat dan pasien AIHA. Rata-rata nilai sel Th 17 pada kelompok sehat dan pasien AIHA ditunjukkan dalam histogram berikut :



Gambar 5.3 Histogram rata-rata sel Th 17

5.5 Analisis Regresi Linier

Analisis regresi linier berganda digunakan untuk mengetahui seberapa besar pengaruh variabel bebas yaitu sel T CD4+ terhadap sel Th17. Hasil analisis terlihat dalam tabel berikut:

Tabel 5.6 Hasil Analisis Regresi Linier

Variabel	Konstanta	Koefisien regresi	Nilai R	Nilai p	Keterangan
Sel T CD4+ dan Th17	0,865	-0,832	-0,381	0,066	Tidak berbeda bermakna

Dari tabel di atas maka persamaan regresi persamaan regresi sebagai berikut:
 $Th17 = 0.865 - 0.832 CD4+$

Dari persamaan regresi tersebut, diketahui bahwa:



- a. Nilai konstanta sebesar 0,865 memiliki arti jika variabel sel T CD4+ sama dengan 0 (nol), maka sel Th17 sebesar 0,865.
- b. Koefisiensi regresi sel T CD4+ sebesar -0,832 menunjukkan bahwa kenaikan CD4+ sebanyak 1 satuan akan menyebabkan sel Th17 turun sebesar -0,832 dan sebaliknya.
- c. Dari hasil analisis regresi linier pada tabel di atas terlihat bahwa variabel sel T CD4+ menunjukkan nilai signifikan t sebesar $0,066 > 0,05$, berarti tidak ada pengaruh yang signifikan dari variabel sel T CD4+ terhadap variabel sel Th17. Dengan demikian dapat disimpulkan bahwa hipotesis ditolak. Sel T CD4+ tidak berpengaruh signifikan terhadap sel Th17.

Pengaruh sel T CD4+ terhadap sel Th17 ditunjukkan dalam grafik berikut :



Gambar 5.4 Pengaruh Sel T CD4+ terhadap sel Th 17



BAB VI PEMBAHASAN

6.1 Persentase sel T CD4+ pada pasien AIHA

Dalam hasil penelitian ini didapatkan perbedaan yang signifikan antara persentase sel T CD4+ pada pasien AIHA dibandingkan subjek normal. Pada pasien AIHA didapatkan persentase sel T CD4+ yang lebih rendah dibandingkan dengan subjek normal. Sesuai dengan hasil beberapa penelitian sebelumnya.

Regulasi yang dimediasi sel-T dari sistem kekebalan humoral telah terbukti memainkan peran penting dalam hilangnya toleransi diri dalam AIHA. Dalam beberapa tahun terakhir peningkatan respon proliferasi in vitro dari sel T dan peningkatan sitotoksitas sel pembunuh alami terhadap autologous sel darah merah telah dijelaskan dalam AIHA (Barcellini, 2015). Selain itu, CD4+ CD25+ Tregs sekarang dikenal sebagai pemain kunci dalam toleransi imunologi dan, dengan demikian, dalam mencegah AIHA dan gangguan autoimun poliklonal lainnya. Ward dkk pertama menggambarkan autoantigen spesifik, klon Treg yang mensekresikan IL-10 pulih secara ex vivo dari pasien dengan AIHA. Klon ini diakui sebagai peptida, 72H-86L, berasal dari autoantigen Rh RBC dan diekspresikan penanda T regulasi yang berbeda tergantung pada kondisi aktivasi: CD25 dan LAG-3 tingkat tinggi saat berkembang tidak spesifik, tetapi FoxP3 setelah aktivasi oleh autoantigen yang mereka kenali. Baru-baru ini, Treg CD4+ yang beredar ditemukan berkurang dalam pasien dengan AIHA, bersama dengan kadar IL-10 dan 92 IL-12 yang tinggi. Diketahui



bahwa Treg menghasilkan IL-10 dan TGF- β , dan ketidakseimbangan IL-10/IL-12 mungkin memainkan peran penting dalam timbulnya dan / atau pemeliharaan AIHA. Beberapa kelainan lain dari sitokin immunoregulator telah dilaporkan dalam AIHA: kadar serum IL-1 α , IL-2/IL-2R, IL-6, dan IL-21 ditemukan meningkat; dalam percobaan kultur, sitokin Th1 yaitu IL-2 dan IL-12 dilaporkan meningkat, sedangkan IFN- γ ditemukan berkurang. Selain itu, sitokin Th2 yaitu IL-4 dan IL-13 dilaporkan meningkat, bersama dengan peningkatan produksi IL6, IL-10, dan IL-17. Pasien dengan hemolisis aktif menunjukkan lebih lanjut pengurangan IFN- γ dan peningkatan sekresi TGF- β . Lebih-lebih lagi, penambahan IL-4, IL-6, IL-10, IL-13, dan TGF- β meningkatkan sekresi autoantibodi sekresi dalam kultur. Semua data ini mendukung mengurangi Th1- dan profil mirip Th2 yang dominan dalam imunopatogenesis AIHA, berbeda dengan peran umum CD8+ Sel T sitotoksik yang mensekresi IFN- γ dalam autoimunitas spesifik organ (yaitu multiple sclerosis, ensefalomyelitis autoimun eksperimental, diabetes tipe 1, dan tiroiditis autoimun) (Barcellini, 2015).

Ada bukti eksperimental in vitro dan in vivo yang menyatakan bahwa sel T dan/atau B yang spesifik untuk self-antigen dapat diaktifkan, jika presentasi antigen dan kostimulasi memadai. Aktivasi poliklonal terjadi pada pasien dengan AIHA. Autoantibodi RBC hadir pada kedua kelompok, individu yang sehat dan pasien AIHA, tetapi tingkat autoantibodi dan spesifitas lebih tinggi dan condong pada kelompok yang terakhir. Penelitian lain menunjukkan keterlibatan subpopulasi B-1 limfosit B pada AIHA tidak seperti selfreactive konvensional sel B di perifer dan sumsum tulang, self-reactive sel B-1 di rongga peritoneum dipisahkan dari sel darah merah sel dan karena itu dapat lolos dari penghapusan klon (Semple dan Freedman, 2005)



Untuk mendukung hipotesis *self-ignorance* pada AIHA, peptida sintesis yang sesuai dengan urutan polipeptida Rh, target paling sering untuk autoantibodi pada AIHA tipe hangat, diuji secara *in vitro* untuk kemampuannya merangsang sel T normal. Beberapa peptida memicu aktivasi sel T, dan proliferasinya dapat diblokir oleh antibodi anti-HLA-DR. Sel T autoreaktif pada AIHA mungkin tidak dapat dihapus tetapi bersifat anergik terhadap polipeptida Rh autologous dan dengan demikian secara imunologis mengabaikan *self-antigen* RBC. Selain itu, ada data eksperimen bahwa produksi autoantibodi dalam beberapa kasus AIHA disebabkan oleh: aktivasi sel T helper kelas II terbatas khusus untuk cryptic epitop Rh53, sel T autoreaktif ini tampaknya lolos penghapusan klonal dan anergi selama induksi toleransi diri dan tetap diam, bahkan jika autoantigen yang mereka kenali ada. Pada AIHA, *ignorant* sel T bisa menjadi diaktifkan melalui peristiwa independen, seperti persisten stimulasi antigen lingkungan lintas-reaktif atau perubahan yang diinduksi sitokin Th1 dalam pemrosesan autoantigen yang memicu presentasi epitop sama (Semple dan Freedman, 2005)

Pada pasien dengan AIHA, kadar proliferasi sel T *in vitro* meningkat lebih dari dua kali lipat dari kontrol, konsisten dengan keadaan hiperaktivasi. Namun, setelah stimulasi anti-CD3, respon proliferaatif dari sel T sangat berkurang, sementara produksi IL-10 dan IL-2 meningkat. Produksi basal IL-4 dan TNF- α juga meningkat dalam kultur PBMC dari pasien dengan AIHA. Secara keseluruhan, data menunjukkan bahwa pada AIHA, kelainan sitokin ada dan berhubungan dengan sumbu Th1/Th2; respons sitokin dapat berkontribusi pada imunopatogenesis dari AIHA. Lebih khusus, IL-10 dapat



menginduksi autoimunitas sel darah merah, dan menjaga penyakit dengan terus menerus produksi autoantibodi (Semple dan Freedman, 2005)

Sebuah teori diajukan berupa *two hit of autoimmunity* yang menyatakan bahwa dengan adanya pemicu lain, seperti limfopenia, hilangnya kontrol atas homeostasis dapat mengakibatkan timbulnya autoimunitas. Salah satu kondisi yang bisa menimbulkan kondisi autoimun adalah limfopenia. Limfopenia mendorong induksi autoimun inflamasi oleh sel TCD4+ dari darah perifer berupa syngeneic reaktif self. (Sheu and Chiang, 2021)

Limfopenia telah ditemukan pada *primary immunodeficiency disorder (PID)*, seperti *Omen syndrome* dan *Wiskott-Aldrich syndrome (WS)* (Park et al. 2004). PID adalah kelainan genetik yang mempengaruhi bagian yang berbeda dari sistem imun.

Pasien dengan PID memiliki tingkat yang lebih tinggi kerentanan terhadap infeksi.

Selain itu, mereka dapat cenderung mengalami disregulasi imun termasuk keganasan, alergi, peradangan, dan autoimun penyakit. PID adalah gangguan monogenik; oleh karena itu, hubungan spesifik dengan autoimunitas menunjukkan pentingnya pemberian tertentu gen dalam autoimunitas/toleransi (Schmidt et al., 2017). Dilaporkan 70% pasien dengan WAS menderita setidaknya salah satu gangguan autoimun berikut: anemia hemolitik, neutropenia, artritis, vaskulitis kulit, glomerulonefritis, atau penyakit radang usus. Gangguan ini disebabkan oleh mutasi protein WAS (WASP). WASP sangat penting dalam pensinyalan seluler ke sitoskeleton aktin untuk memediasi fungsi beberapa jenis sel dalam sistem imun (Sheu and Chiang, 2021)



Linfopenia, bagaimanapun juga, meskipun sering dikaitkan dengan penyakit autoimun, tampaknya tidak cukup saja untuk pengembangan autoimunitas manusia, diperlukan juga faktor lain seperti faktor lingkungan dan faktor genetik untuk berkembang menjadi penyakit klinis

6.2 Persentase Sel Th17 pada pasien AIHA

Sampai saat ini, paradigma dominan untuk pemahaman patogenesis penyakit autoimun dinyatakan bahwa sel Th1 dan Th2 mengatur respons autoimun. Namun demikian, penemuan subset baru dari sel T CD4+, dinamai Th17 ditandai dengan sitokin IL-17. Banyak studi baru akhi-akhir ini menunjukkan bahwa sel Th17 adalah penggerak utama respon inflamasi dalam berbagai penyakit autoimun. Sebuah penelitian terbaru menunjukkan peningkatan ekspresi sel Th17 dan IL-17 pada AIHA (Xu *et al.*, 2012). Namun dalam penelitian ini didapatkan hasil tidak ada perbedaan antara persentase sel Th17 antara pasien AIHA dengan subjek normal.

Pada AIHA, sitokin inflammatory sel Th17 yaitu IL-17 diduga tidak berkaitan dengan stimulasi respons-respons sel B. Penelitian akhir-akhir ini pada hewan coba mencit menunjukkan bahwa sel-sel Th17 dapat berfungsi sebagai *helpers* bagi respons antibodi, yang mampu menstimulasi sel-sel B untuk berproliferasi, *switch class* ke produksi IgG dan membentuk *germinal centers* (Hall *et al.*, 2012)

Beberapa penelitian dilakukan terkait dengan peran penting sel-sel Th17 pada AIHA. Penelitian oleh Xu *et al.*, 2012, menunjukkan hasil bahwa pada pasien, peningkatan sel-sel Th17 berkaitan erat dengan aktifitas penyakit, termasuk kadar antibodi IgG anti-RBC, hemoglobin, C3 serum, dan aktifitas *lactate dehydrogenase*.



Pada penelitian tersebut juga menunjukkan bukti bahwa IL-17 juga berkaitan erat dengan aktivitas penyakit pada pasien AIHA. Sel-sel Th17 mempengaruhi perkembangan AIHA dengan meningkatkan respons-respons imun humoral adaptif. Secara khusus juga ditemukan bahwa transfer adoptif sel-sel Th17 meningkatkan respons-respons awal antibodi anti-rat RBC dan juga mempercepat onset AIHA. Selain itu, netralisasi IL-17 *in vivo* menghambat terjadinya AIHA dan menggagalkan inisiasi respons IgG anti-rat RBC dan induksi AIHA pada mencit IL-17^{-/-} (Xu *et al.*, 2012).

Kemungkinan persentase sel Th17 tidak berbeda jauh dari subjek normal karena aktivitas penyakit yang sudah menurun/rendah ataupun pasien sudah mendapatkan terapi sebelumnya. Hal tersebut dapat juga disebabkan oleh karena pemberian terapi kortikosteroid pada pasien AIHA. Suatu penelitian menyebutkan adanya pengaruh kortikosteroid (metilprednisolon) dalam menghambat interleukin 17.

Glukokortikoid (GC) adalah hormon steroid yang merupakan salah satu obat immunosupresif dan antiinflamasi paling kuat yang tersedia saat ini. Glukokortikoid sintesis berkhasiat dalam pengobatan berbagai inflamasi dan penyakit autoimun dan dalam mencegah penolakan cangkok, sementara glukokortikoid yang diproduksi secara endogen memainkan peran penting dan peran kompleks dalam regulasi respon sistem imun. Telah terbukti mempengaruhi keduanya, sistem imun bawaan dan respon imun adaptif dengan mempengaruhi peredaran sel, proliferasi, ekspresi molekul permukaan, seperti MHC, co-stimulator dan molekul adhesi, dan sintesis banyak mediator inflamasi, termasuk sitokin. Glukokortikoid telah mengerahkan sebagian besar, jika tidak semua, dari efeknya melalui pengikatan pada reseptor



glukokortikoid (GR), faktor transkripsi yang diaktifkan ligan. Pengaruh glukokortikoid pada fungsi sel T baik langsung maupun tidak langsung, melalui sel penyaji antigen (APC). Diketahui bahwa kompleks GC-GR menghambat fungsi sel T dan APC dengan mempengaruhi faktor transkripsi kunci yang terlibat dalam regulasi ekspresi sejumlah sitokin inflamasi, seperti seperti IFN- γ , TNF- α dan IL-2. Selain itu, beberapa penelitian dengan jelas menunjukkan baik pada hewan coba maupun manusia bahwa adanya pengaruh glukokortikoid meningkatkan sitokin Th-2, IL-4, IL-10 dan IL-13 bersamaan dengan penurunan sekresi sitokin Th-1 oleh limfosit CD4+ (Momcilovic *et al.*, 2008)

Dalam suatu laporan penelitian, metilprednisolon tampaknya hanya sebagian efektif dalam memblokir produksi IL-17 yang dipicu ionomisin secara *in vitro* oleh limfosit dari manusia yang sehat dibandingkan dengan penghambatan yang ekstrim oleh siklosporin A dalam pengaturan yang sama. Pengaruh glukokortikoid pada ekspresi IL-17 *in vivo* ditunjukkan dalam spesimen biopsi bronkial pasien asma sedang hingga berat dengan menunjukkan jumlah sel penghasil IL-17 menurun ke tingkat yang ditemukan dalam kontrol normal setelah pengobatan oral dengan glukokortikoid. Penelitian lain membuktikan bahwa metilprednisolon berpotensi menghambat ekspresi dan produksi IL-17 dalam respons sel T terstimulasi mitogen yang kuat, serta dalam respons limfosit T spesifik antigen yang lebih halus. Banyak produksi sitokin yang telah terbukti penting untuk stimulasi IL-17 dalam sel T, seperti IL-1, TNF- α , IL-6, IL-18, dapat terpengaruh pada makrofag dan sel dendritik oleh pengaruh glukokortikoid. Metilprednisolon menghambat produksi IL-6 dalam populasi kelenjar limfe tanpa limfosit T. Demikian diharapkan metilprednisolon lebih mempengaruhi produksi IL-17 di kelenjar limfe lebih kuat daripada di sel T murni.



Selanjutnya, di antara sel-sel dari kelenjar limfe ada jenis sel lain, selain sel T, yang bisa menjadi sumber IL-17 yang relevan, dan itu dapat berkontribusi pada perbedaan yang diamati (Momicilovic *et al.*, 2008)

Sel Th17, setidaknya pada percobaan pada tikus, berkembang dari sel T CD4+ naif di bawah pengaruh TGF- β dan IL-6, membutuhkan IL-23 untuk kelangsungan hidup dan ekspansi dan mengeluarkan profil sitokin inflamasi termasuk IL-17 dan IL-17F, IL-6, GM-CSF, TNF- α , IL-21 dan IL-22. IL-17 telah muncul sebagai patogen penting faktor dalam beberapa penyakit autoimun dan menginduksi inflamasi pada hewan percobaan, seperti eksperimental ensefalomyelitis autoimun (EAE), collagen induced arthritis (CIA), penyakit radang usus (IBD), sebelumnya dianggap dimediasi oleh sel Th1. Menariknya, sel T CD4+ naif dapat berdiferensiasi menjadi fenotipe subtype Th17 non-patogen tergantung pada sub tipe faktor pertumbuhan tumor- β yang digunakan untuk menginduksi diferensiasi Th17. Th17 dihasilkan dengan faktor pertumbuhan tumor- β 1 dan IL-6 menghasilkan IL-17 tetapi tidak dapat mendorong patologi autoimun tanpa adanya IL-23, sedangkan Th17 yang dihasilkan dengan faktor pertumbuhan tumor- β 3 dan IL-6 menentukan subset efektor pathogen yang dapat menginduksi autoimunitas, seperti yang ditunjukkan pada model tikus percobaan autoimun ensefalitis. Studi-studi ini menggambarkan bahwa kompleksitas lingkungan sitokin adalah kunci dalam mengarahkan karakteristik fungsional spesifik sel efektor Th17, yang dengan demikian dapat memainkan peran patogen atau pengatur dalam penyakit inflamasi (Zenobia and Hajishengallis, 2015). Oleh karenanya diperlukan juga pemeriksaan untuk mengetahui kadar dari sitokin IL-6 dan



IL-23 serta TGF- β dalam penelitian selanjutnya yang terlibat dalam proses perkembangan sel T CD4+ menjadi Th17.

Penelitian ini memiliki beberapa keterbatasan, antara lain sitokin yang dimungkinkan berpengaruh pada hubungan sel T CD4+ dan Th17 (IL-17) seperti TGF- β , IL-6, IL-21, IL-23, tidak diteliti sehingga hubungan kausalitas belum dapat dibuktikan. Pada penelitian ini tidak dibedakan tipe dari AIHA, dimana masing-masing tipe AIHA mempunyai patogenesis yang berbeda sehingga dapat mempengaruhi hasil penelitian. Selain itu, terapi kortikosteroid yang dikonsumsi oleh pasien bisa jadi mempengaruhi hasil penelitian. Dibutuhkan penelitian eksperimental lebih lanjut dengan kriteria inklusi yang lebih ketat dan menambah variable sitokin yang berpengaruh serta memperbanyak jumlah sampel penelitian sehingga dapat menjelaskan lebih dalam patofisiologi molekular dan AIHA



BAB VII

KESIMPULAN DAN SARAN

7.1 Kesimpulan

Dari penelitian ini, kesimpulan yang dapat diambil adalah sebagai berikut:

1. Persentase sel T CD4+ pada pasien AIHA lebih rendah dibandingkan dengan pada subjek normal
2. Persentase sel Th17 pada pasien AIHA dan subjek normal tidak didapatkan perbedaan

7.2 Saran

Berikut ini adalah beberapa saran yang dikemukakan dari penelitian ini untuk meningkatkan manfaat yang dapat diperoleh di masa mendatang, antara lain sebagai berikut :

1. Diperlukan penelitian lebih lanjut dengan senter penelitian multiple dan jumlah sampel yang lebih besar untuk mendapatkan hasil penelitian yang lebih representative
2. Diperlukan penelitian lebih lanjut dengan data subjek penelitian (pasien AIHA) yang lebih lengkap, riwayat pengobatan
3. Diperlukan penelitian kohort yang membandingkan jumlah sel T CD4+ dan sel Th17 pada pasien AIHA sebelum dan sesudah dilakukan terapi



DAFTAR PUSTAKA

- Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. 2012. Cellular and Molecular Immunology, 7th ed., Saunders: Philadelphia, PA, USA
- Almécija AC, Pérez V, Baro M, Guerra-García P, Vivanco JP. 2019. Atypical Autoimmune Hematologic Disorders in a Patient with Kabuki Syndrome. *J. Pediatr. Hematol. Oncol.* 41, e114–e115.
- Angileri F, Légare S, Marino Gammazza A, Conway de Macario E, Macario AJL, Cappello F. 2020. Is molecular mimicry the culprit in the autoimmune haemolytic anaemia affecting patients with COVID-19? *Br. J. Haematol.* 190, e92–e93.
- Barcellini W, Fattizzo B, Zaninoni A. 2018. Current and emerging treatment options for autoimmune hemolytic anemia. *Expert Rev Clin Immunol.* 14(10):857–72.
- Barcellini W, Zanella A. 2011. Rituximab therapy for autoimmune haematological diseases. *Eur J Intern Med.* 22:220–229.
- Barcellini W, Zaninoni A, Fattizzo B, Giannotta JA, Lunghi M, Ferrari A, *et al.* 2018. Predictors of refractoriness to therapy and healthcare resource utilization in 378 patients with primary autoimmune hemolytic anemia from 8 Italian reference centers. *Ann J Hematol.* DOI:10.1002/ajh.25212.
- Barcellini W. 2015. New Insights in the Pathogenesis of Autoimmune Hemolytic Anemia. *Transfus. Med. Hemother.* 42, 287–293.
- Barcellini W, Fattizzo B. 2020. The Changing Landscape of Autoimmune Hemolytic Anemia. *Front. Immunol.* 11: 946
- Benamu E, Montoya JG. 2016. Infections associated with the use of eculizumab: recommendations for prevention and prophylaxis. *Curr Opin Infect Dis.* 29:319–329
- Berentsen S, Tjønnfjord GE. 2012. Diagnosis and treatment of cold agglutinin mediated autoimmune hemolytic anemia. *Blood. Rev.* 26, 107–115.



Burkett PR, Lee Y, Peters A, Kuchroo VK. 2014. T Cells and their Subsets in Autoimmunity. In: N. Rose & I. Mackay (Eds): The Autoimmune Diseases, Fifth edition. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-384929-8.00046-0>, London: Elsevier Inc., pp. 69-79.

Capes A, Bailly S, Hantson P, Gerard L, Laterre PF. 2020. COVID-19 infection associated with autoimmune hemolytic anemia. *Ann. Hematol.* 99, 1679–1680.

Friedberg RC, Johari VP. 2014. Autoimmune haemolytic anemia, in: Greer JP, Arber DA, Glader B, List AF, Means RT, Paraskevas F, et al., *Wintrobe's Clinical Hematology*, 13th Edition. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins: 746-750

Galinier A, Delwail V, Puyade M. 2017. Ibrutinib is effective in the treatment of autoimmune haemolytic anaemia in mantle cell lymphoma. *Case Rep Oncol.* 10:127–129

Garratty G, Arndt PA. 2014. Drugs that have been shown to cause drug-induced immune hemolytic anemia or positive direct antiglobulin tests: some interesting findings since 2007. *Immunohematology* 30, 66–79.

Garratty, G. 2010. Immune hemolytic anemia associated with drug therapy. *Blood Rev.* 24, 143–150.

Gertz MA, Qiu H, Kendall L. 2016. ANX005, an inhibitory antibody against C1q, blocks complement activation triggered by cold agglutinins in human disease. *Blood.* 128:1265.

Grossi FV, Bedwell P, Deschatelets P. 2016. APL-2, a complement C3 inhibitor for the potential treatment of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH): phase I data from two completed studies in healthy volunteers. 58th annual meeting of the American Society of Hematology; 3–6; San Diego, CA.

Hadijadi J, Aladjidi N, Fernandes H, Leverger G, Magérus-Chatinet A, Mazerolles F, et al. 2019. Members of the French Reference Center for Pediatric Autoimmune Cytopenia (CEREVANCE). *Pediatric Evans*



syndrome is associated with a high frequency of potentially damaging variants in immune genes. *Blood*. 134, 9–21

Hall AM, Zamzami OM, Whibley N, Hampsey DP, Haggart AM, Vickers M, Barker RN. 2012. Production of the effector cytokine interleukin-17, rather than interferon- γ , is more strongly associated with autoimmune hemolytic anemia. *Red Cell Disorder. Hematologica*. 97 (10)

Hill A, Hill QA. 2018. Autoimmune hemolytic anemia. *American Society of Hematology*

Hill QA, Stamps R, Massey E, et al. 2017. British society for haematology guidelines. Guidelines on the management of drug-induced immune and secondary autoimmune, haemolytic anaemia. *Br J Haematol*. 177:208–220

Hill QA, Stamps R, Massey E, Grainger JD, Provan D, Hill A. 2017. British Society for Haematology. Guidelines on the management of drug-induced immune and secondary autoimmune haemolytic anaemia. *Br. J. Haematol*. 177, 208–220

Hoyer KK, Kuswanto WF, Gallo E, Abbas AK. 2009. Distinct roles of helper T-cell subsets in a systemic autoimmune disease. *The American Society of Hematology*. Vol.113:2.

Hudnall SD. 2012. *Hematology: a Pathophysiologic Approach*, Philadelphia: Mosby-Elsevier Inc., ISBN: 978-0-323-04311-3, p. 38-39

Jäger U, Lechner K. 2013. Ch 44: autoimmune hemolytic anemia, In: Hoffman R, Benz EJ, Silberstein LE, Heslop HE, Weitz JI, Anastasi JM (eds), *Hematology: Basic Principles and Practice*, 6th ed., Canada: Saunders Elsevier, ISBN: 978-1-4377-2928-3, 614-616

Jäger U. 2020. Diagnosis and treatment of autoimmune hemolytic anemia in adults. Recommendations from the First International Consensus Meeting. *Blood Reviews* (41). 100648

Jasinski S, Weinblatt ME, Glasser CL. 2017. Sirolimus as an effective agent in the treatment of immune thrombocytopenia (ITP) and Evans syndrome



(ES): a single institution's experience. *J. Pediatr. Hematol. Oncol.* 39:420–424

Khurana H, Malhotra P, Sachdeva MU. 2018. Danazol increases T regulatory cells in patients with aplastic anemia. *Hematology.* 8:1–5.

Laribi K, Bolle D, Ghnaya H. 2016. Rituximab is an effective and safe treatment of relapse in elderly patients with resistant warm AIHA. *Ann Hematol.* 95:765–769

Lazarian G, Quinquenel A, Bellal M, Siavellis J, Jacquy C, Re D, et al. 2020. Autoimmune haemolytic anaemia associated with COVID-19 infection. *Br. J. Haematol.* 190, 29–31.

Lenert A, Lenert P. 2015. Current and emerging treatment options for ANCA-associated vasculitis: potential role of belimumab and other BAFF/APRIL targeting agents. *Drug Des Devel Ther.* 9: 333–347.

Manda S, Dunbar N, Marx-Wood CR. 2015. Ibrutinib is an effective treatment of autoimmune haemolytic anaemia in chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol.* 170:734–736

Marcus N, Attias D, Tamary H. 2014. Autoimmune hemolytic anemia: current understanding of pathophysiology. *Hematology Education: the education program for annual congress of the European Hematology Association.* 8(1): 331-7

Margot H, Boursier G, Dulos C, Sanchez E, Amiel J, Andrau JC, et al. 2020. Immunopathological manifestations in Kabuki syndrome: A registry study of 177 individuals. *Genet. Med.* 22, 181–188.

McQueen E. 2012. A B cell explanation for autoimmune disease: The forbidden clone returns. *Postgrad. Med. J.* 88, 226–233

Michalak SS, Gawlik AO, Matysek JR, Rokicka EW, Nowakowska E, Gil L. 2020. Autoimmune hemolytic anemia: current knowledge and perspectives. *Immunity&Ageing.* 17:38

Momcilovic M, Miljkovic Z, Popadic D, Markovic M, Savic E, Ramic Z, et al. 2008. Methylprednisolone inhibits interleukin-17 and interferon-gamma



expression by both naïve and prime T cells. *BMC Immunology*. Biomed Central. 9:47

Niss O, Ware RE. 2018. Treatment of Autoimmune Hemolytic Anemia. *Immune Hematology*.

Onishi RM, Gaffen SL. Interleukin-17 and its target organ genes: mechanisms of interleukin-17 function in disease. *Immunology review article*. 129, 311-321

Packman CH. 2015. The Clinical Picture of Autoimmune Hemolytic Anemia. *Tranfusion Medicine and Hemotherapy*. (42): 317-324

Park JA, Lee HH, Kwon HS. 2016. Sirolimus for refractory autoimmune hemolytic anemia after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: a case report and literature review of the treatment of post-transplant autoimmune hemolytic anemia. *Transfus Med Rev*. 30:6-14.

Qasim S. 2018. Background, Presentation and Pathophysiology of Autoimmune Hemolytic Anemia. *Immune Hematology*.

Qu N, Xu M, Mizoguchi I, Furusawa J, Kaneko K, Watanabe K. 2013. Pivotal Roles of T-Helper 17-related cytokines, IL-17, IL-22 and IL-23, in Inflammatory Disease. *Clinical and Developmental Immunology*.

Ramirez F, Fowell DJ, Puklavec M, Simmonds S, Mason D. 2016. Glucocorticoids promote a TH2 cytokine response by CD4+ T cells in vitro. *J Immunol*. 156:2406-2412

Risitano AM, Marotta S. 2018. Toward complement inhibition 2.0: next generation anticomplement agents for paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Am J Hematol*. 93:564-577.

Rossi G, Gramagna D, Paoloni F. 2018. Short course of bortezomib in anemic patients with relapsed cold agglutinin disease: a phase 2 prospective GIMEMA study. *Blood*. 132:547-550



Schmidt RE, Grimbacher B, Witte T. 2017. Autoimmunity and primary immunodeficiency: Two sides of the same coin? *Nat. Rev. Rheumatol.* 14, 7–18

Schulze-Koops H. 2004. Lymphopenia and autoimmune disease. *Arthritis Research and Therapy.* Vol 6 No 4

Semple JW, Freedman J. 2005. Autoimmune Pathogenesis and Autoimmune Hemolytic Anemia. *Seminars in Hematology* 42:122-130

Sheu T, Chiang B. 2021. Lymphopenia, Lymphopenia-Induced Proliferation and Autoimmunity. *International Journal of Molecular Sciences.* 22, 4152

Shi J, Rose EL, Singh A. 2014. TNT003, an inhibitor of the, prevents complement activation induced by cold agglutinins. *Blood.* 2123:4015–4022

Stevens CD. 2010. *Clinical immunology and serology: a laboratory perspective.* 3rd ed., Philadelphia: F.A. Davis Company, p. 212-213

Tabarkiewicz J, Pogoda K, Karczmarczyk A, Pozarowski P, Giannopoulos K. 2014. The Role of IL-17 and Th17 Lymphocytes in Autoimmune Diseases. *Arch. Immunol. Ther. Exp*

Townsend DM, Winkler T. 2016. Nontransplant therapy for bone marrow failure. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* (1): 83–89.

Turgeon ML. 2014. *Immunology & Serology in Laboratory Medicine,* fifth ed., ISBN: 978-0-323-08518-2, St. Louis, Missouri 63043: Mosby, an imprint of Elsevier Inc., pp. 57-58.

Vickers MA, Barker RN. 2014. Ch 46: Autoimmune Hemolytic Anemia, In: N. Rose & I. Mackay (Eds). *The Autoimmune Diseases,* Fifth edition. Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-384929-8.00046-0>, London: Elsevier Inc., 649-653

Vickers MA, Barker RN. 2020. Autoimmune Hemolytic Anemia. *The Auto Immune Disease.* 6th edition. Chapter 47. 897-910



Visentini M, Tinelli C, Colantuono S. 2015. Efficacy of low-dose rituximab for the treatment of mixed cryoglobulinemia vasculitis: phase II clinical trial and systematic review. *Autoimmun Rev*. 2015;14:889–896.

Ward FJ, Hall AM, Cairns LS. 2008. Clonal regulatory T cells specific for a red blood cell autoantigen in human autoimmune hemolytic anemia. *Blood*. 111:680–687.

Xu ZZ, Zhao BB, Xiong H. 2015. Serum BAFF and APRIL levels in patients with autoimmune hemolytic anemia and their clinical significance. *Int J Hematol*. 2015;102:394–400.

Xu L, Zhang T, Liu Z, Li Q, Xu Z, Ren T. 2012. Critical role of Th 17 cells in development of autoimmune hemolytic anemia. *Experimental Hematology*. 40:994-1004

Zeerleder S. 2011. Autoimmune haemolytic anemia a practical guide to cope with a diagnostic and therapeutic challenge. *The Netherland journal of medicine*, vol 69, p 177-182.

Zenobia C, Hajishenallis G. 2015. Basic biology and role of interleukin in immunity and inflammation. 69 (1): 142-159

Zhuang H, Kosboth M, Sipos JA, Satch M, Yang L, Reeves WH. 2009. Ch 6. Autoimmunity, in: Zabriskie JB (editor): *Essential Clinical Immunology*, Cambridge University Press, p.102



Lampiran 1. Kelainan etik



KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI, DAN PENDIDIKAN TINGGI

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

FAKULTAS KEDOKTERAN

KOMISI ETIK PENELITIAN KESEHATAN

Jalan Veteran Malang 50143, Jawa Timur, Indonesia
Telp. (0341) 551611 Ext. 168, 569117, 567192 - Fax. (03) (0341) 564755
http://www.fkub.uns.ac.id/ - Email: fkep@fkub.uns.ac.id

**KETERANGAN KELAINAN ETIK
("ETHICAL CLEARANCE")**

No. 145 / EC / KEPK / 05 / 2019

KOMISI ETIK PENELITIAN KESEHATAN FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS BRAWIJAYA, SETELAH MEMPELAJARI DENGAN SEKSAMA RANCANGAN PENELITIAN YANG DIUSULKAN, DENGAN INI MENYATAKAN BAHWA PENELITIAN DENGAN

JUDUL : Pengaruh Medan Elektromagnetik Frekuensi Radio pada Subset Sel T Halper Kultur Periferah Blood Mononuclear Cells terhadap Pasien Autoimmune Hemolytic Anemia melalui Penlokatan Kalsium Introsel.

PENELITI UTAMA : dr. Ibrahim Zudhanah Arhanirin, M.Kes, Sp.FB.

ANGGOTA :
 dr. Dian Luminto
 dr. Intan Merdekadini Gunung
 dr. Efrko Septananda Saifullah
 dr. Kokania Malsyarah Qursum
 Bunga Segatiyana
 Dewi Anroti
 Karina rahmawati Editya Putri
 Fara Fildia Putri
 Farisa Nur Affia
 Oca Fatmaha Rea

UNIT / LEMBAGA : Fakultas Kedokteran - Universitas Brawijaya Malang.

TEMPAT PENELITIAN :
 • Instalasi Laboratorium Sentral Rumah Sakit Umum Dr. Saiful Anwar Malang
 • Laboratorium Patologi Klinik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang
 • Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang

DINYATAKAN LAIK ETIK

Malang,
Ketua



Prof. Dr. dr. Moch. Huzar F.E.S., Sp.S, Sp.BS(K), Sp. M, Hum. Dr(HK)
NIPK. 20180245051611001

Catatan :

Kelengkapan LUK Bersin Berku 1 (Satu) Tahap Sejak Tanggal Oksulasinya Pada Akhir Penelitian, Laporan Hasil Penelitian Wajib Diserahkan Kepada KEPK-FKUB Dalam Bentuk Hard Copy. Jika Ada Perubahan Protokol Dan / Atau Bermanajemen Penelitian, Haru Mengajukan Kembali Permohonan Kelainan Etik Penelitian (Amendemen Protokol)



Lampiran 2. Uji Normalitas

Tests of Normality^a

Kelompok	Kolmogorov-Smirnov ^e			Shapiro-Wilk			
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.	
CD4+	Subyek Sehat	.260	12	.024	.813	12	.013
	Pasien AIHA	.174	12	.200 ^a	.957	12	.746
CD4+Th17	Subyek Sehat	.185	12	.200 ^a	.915	12	.247
	Pasien AIHA	.223	12	.103	.860	12	.050

*. This is a lower bound of the true significance.

a. Lilliefors Significance Correction



Lampiran 3. Uji Homogenitas

Test of Homogeneity of Variance

		Levene Statistic	df1	df2	Sig.
CD4+	Based on Mean	104.279	1	22	.000
	Based on Median	100.807	1	22	.000
	Based on Median and with adjusted df	100.807	1	21.061	.000
	Based on trimmed mean	104.225	1	22	.000
CD4+Tn17	Based on Mean	.704	1	22	.410
	Based on Median	.310	1	22	.583
	Based on Median and with adjusted df	.310	1	20.640	.584
	Based on trimmed mean	.593	1	22	.449



Lampiran 4. Uji Beda (Uji Mann-Whitney)

NPar Tests

Mann-Whitney Test

		Ranks		
CD4+	Kelompok	N	Mean Rank	Sum of Ranks
	Subyek Sehat	12	17.75	213.00
	Pasien AIHA	12	7.25	87.00
	Total	24		

Test Statistics^a

CD4+		
	Mann-Whitney U	9.000
	Wilcoxon W	87.000
	Z	-3.642
	Asymp. Sig. (2-tailed)	.000
	Exact Sig. [2* (1-tailed Sig.)]	.000 ^b

a. Grouping Variable: Kelompok

b. Not corrected for ties.



Summarize

Case Processing Summary

	Cases					
	Included	Excluded	Total	N	Percent	Percent
CD4+ * Kelompok	24	0	24	100.0%	0.0%	100.0%

Case Summaries

Kelompok	Mean	Std. Deviation
Subyek Sehat	.292458	.0241183
Pasien AIHA	.261642	.0063707
Total	.277050	.0233528



**Lampiran 6. Uji Regresi Linier
Regression**

Variables Entered/Removed^a

Model	Variables Entered	Variables Removed	Method
1	CD4+ ^b		Enter

- a. Dependent Variable: CD4+Th17
- b. All requested variables entered.

Model Summary

Model	R	R Square	Adjusted R Square	Std. Error of the Estimate
1	.381 ^a	.146	.107	.0481293

- a. Predictors: (Constant), CD4+

ANOVA^a

Model		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
1	Regression	.009	1	.009	3.747	.066 ^b
	Residual	.051	22	.002		
	Total	.060	23			

- a. Dependent Variable: CD4+Th17
- b. Predictors: (Constant), CD4+



Model	Coefficients ^a		Standardized Coefficients		t	Sig.
	B	Std. Error	Beta	t		
1	(Constant)	.865			7.237	.000
	CD4+	-.832			-1.936	.066

a. Dependent Variable: CD4+Th17



Lampiran 7

Dokumentasi

