

APLIKASI KLINIS RETIKULOSIT

Ketut Suega

Divisi Hematologi-Onkologi Medik Bagian/SMF Ilmu Penyakit Dalam FK Unud/RSUP Sanglah

Email: ksuega@yahoo.com

ABSTRACT

Reticulocytes are immature nonnucleated erythrocytes that are released from the bone marrow following enucleation of the normoblast. Under the influence of erythropoietin, committed erythroid progenitor cells divide and differentiate through a series of stages, giving rise basophilic normoblasts, polychromatophilic normoblasts, and orthochromic normoblasts in sequence. Reticulocytes are similar to mature red blood cells, except that they retain functioning polyribosomes and continue to synthesize hemoglobin. Because the reticulocyte stage of erythroid differentiation only lasts a few days, the number of reticulocytes in the blood is a useful clinical indicator of the rate of erythropoiesis. Reticulocytes exist in the circulation for only 1 – 2 days and signal the marrow erythropoietic activity 3 – 4 days after iron was actively incorporated into haemoglobin. Early changes in reticulocyte count may simply reflect the release of immature reticulocytes from the marrow rather than the true expansion of erythropoiesis. Reticulocyte counts have once again acquired great interest and importance following the introduction of instruments that use dyes specific for RNA. This has resulted in precise and accurate counts even at low reticulocyte concentrations. The latest generation of automated analyzer provides additional information on reticulocytes, such as the immature reticulocyte fraction (IRF) and other reticulocyte indices, eg, mean reticulocyte volume (MCVr) and mean reticulocyte haemoglobin content (CHr). To date, the most widely studied of the reticulocyte indices is the CHr. The hemoglobin content is considered to be constant throughout the lifetime of erythrocytes and circulating reticulocytes¹ unless structural changes take place that compromise the amount of cytoplasm or cause cellular fragmentation. The normal value for the flowcytometry method can range from 1% to 2% depending on the cut off point used to separate reticulocytes from the normal red blood cell population. Since reticulocyte enumeration provides information about the bone marrow activity and the effectiveness of red blood cell production, it is crucial in the clinical application of reticulocytes parameters to aid the diagnosis of anemic patients, and for monitoring bone marrow transplantation patients, patients undergoing therapy with marrow toxic drugs, and patients being treated for anemia.

Keywords: flowcytometry, reticulocytes, clinical applications

PENDAHULUAN

Retikulosit adalah Sel Darah Merah (SDM) yang masih muda yang tidak berinti dan berasal dari proses pematangan normoblas di sumsum tulang. Sel ini mempunyai jaringan organela basofilik yang terdiri dari RNA dan protoforpirin yang dapat berupa endapan dan berwarna biru apabila dicat dengan pengecatan

biru metilin. Retikulosit akan masuk ke sirkulasi darah tepi dan bertahan kurang lebih selama 24 jam sebelum akhirnya mengalami pematangan menjadi eritrosit. Pada pasien tanpa anemia hitung retikulositnya berkisar antara 1 – 2%. Jumlah ini penting karena dapat digunakan sebagai indikator produktivitas dan aktivitas eritropoiesis di sumsum tulang dan membantu untuk menentukan klasifikasi anemia sebagai hiperproliferatif,

normoproliferatif, atau hipoproliferatif. Penghitungan jumlah retikulosit ini bisa dilakukan dengan metode manual menggunakan pengecatan supravital dan bisa dengan analisa otomatis flowsitometer.¹⁻³

Pemeriksaan retikulosit kembali mendapat perhatian yang penting setelah ditemukannya pemeriksaan dengan alat yang lebih canggih dengan pewarnaan yang spesifik untuk RNA. Hasil pemeriksaan ini jauh lebih tepat dan akurat walaupun pada konsentrasi retikulosit yang rendah. Bahkan generasi terakhir dari alat ini mampu memberikan informasi tambahan seperti adanya gambaran fraksi retikulosit muda (IRF) dan beberapa parameter lainnya seperti MCVr (*Reticulocyte Mean Corpuscular Volume*), MCHCr (*Reticulocyte Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration*) dan rerata kadar hemoglobin dalam retikulosit (CHR).^{4,5} Kadar retikulosit darah mencerminkan ukuran kuantitatif dari eritropoiesis, sedangkan parameter retikulosit lebih memberikan informasi kondisi tentang kualitas retikulosit. Sekarang ini indeks retikulosit yang banyak dipakai diklinis adalah CHR. Kandungan hemoglobin dianggap konstan sepanjang masa hidup dari eritrosit dan retikulosit kecuali kalau ada perubahan struktural yang menyebabkan terjadinya gangguan fungsi dan fragmentasi intraseluler. Selama proses perkembangannya retikulosit di dalam sumsum tulang akan membuat hemoglobin. CHR yang merupakan refleksi pembuatan hemoglobin yang terbaru di sumsum tulang juga merupakan cermin dari adanya cadangan besi yang adekuat. Hal ini lebih bermanfaat dibandingkan pemeriksaan butir-butir besi di sumsum tulang yang merupakan perkiraan kasar dari cadangan besi di dalam sistem retikuloendotelial.⁶

Aktifitas eritropoietik di dalam sumsum tulang dan kecepatan pengeluaran sel dari sumsum tulang ke darah tepi akan menentukan jumlah retikulosit di darah tepi, oleh karenanya pemeriksaan retikulosit ini mempunyai peran klinis yang krusial dalam hal: membantu diagnosis penderita anemia, untuk monitoring proses transplantasi sumsum tulang, juga

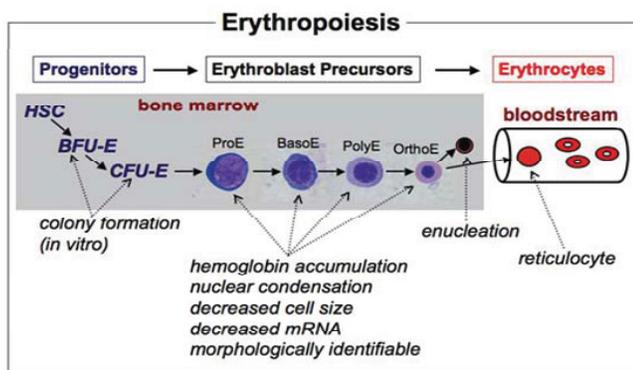
penderita-penderita yang mendapatkan kemoterapi serta monitoring penderita yang mendapat perawatan untuk anemianya.⁷

ERITROPOIESIS

Seperti sel lainnya yang beredar di darah tepi, SDM berasal dari *pluripotential hematopoietic stem cell* di bawah pengaruh lingkungan mikro sumsum tulang dan beberapa jenis sitokin tertentu yang bekerja pada fase awal dari hematopoiesis. Sel induk ini akan berkembang menjadi *stem cell* yang *committed* untuk satu jenis sel darah. Pada proses eritropoiesis sel ini disebut sebagai *committed eritroid progenitor cell*. Pada fase ini sel ini belum bisa dibedakan dengan *stem cell* lainnya dan seperti juga *stem cell*, sel induk eritroid ini beredar secara bebas di darah tepi. Pada tingkat ini mulai akan diekspresikan reseptor sitokin khusus yaitu EpoR (*receptor for erythropoietin*). Eritropoietin ini akan merangsang proses proliferasi dan hiperplasia dari sel induk eritroid. Apabila eritropoietin ini tidak ada maka sel induk eritroid akhirnya akan mati (apoptosis). Eritropoietin manusia merupakan glikoprotein 193-aminoacid dengan berat molekul 34 KD. Sekitar 90% eritropoietin ini dihasilkan di ginjal dan sisanya berasal dari organ ekstrarenal.^{8,9}

Hipoksia atau anemia akan merangsang sel yang memproduksi eritropoietin akan membuat dan melepaskan eritropoietin ini ke dalam darah dan akan beredar menuju ke jaringan yang membutuhkannya terutama sel progenitor eritroid di sumsum tulang untuk memacu proses pembentukan SDM (eritropoiesis). Sebagai akibatnya akan terjadi peningkatan pelepasan retikulosit ke darah tepi sehingga bisa mengatasi keluhan anemia. Sehingga apabila didapatkan konsentrasi retikulosit yang rendah pada penderita dengan infeksi kemungkinan hal ini disebabkan oleh karena produksi eritropoietin yang tidak adekuat atau respon sel induk eritroid yang sub optimal.¹⁰ Oleh karena aktivitas eritropoietin ini sangat spesifik terhadap sel eritroid

maka sekarang ini banyak dikembangkan rekombinan eritropoietin yang bersal dari manusia, yang digunakan secara luas untuk mengobati penderita anemia pada gagal ginjal atau penekanan sumsum tulang akibat keganasan.¹¹⁻¹³ Bahkan akhir-akhir ini banyak diduga disalah gunakan sebagai *doping* oleh para atlit papan atas untuk meningkatkan performannya.¹⁴



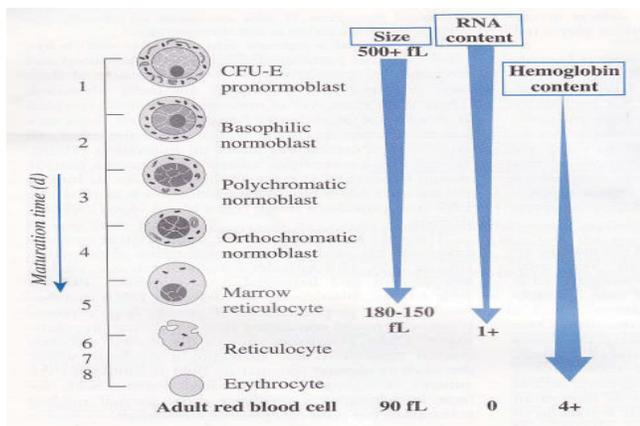
Gambar 1. Eritropoiesis¹⁰

Di bawah pengaruh eritropoietin maka sel induk eritroid akan membelah dan berdiferensiasi. Mula-mula akan muncul sel pronormoblast yang merupakan sel besar dan pada sel inilah pertama kali ditemukan adanya pembentuk hemoglobin. Dan mulai fase ini sel muda dari garis keturunan eritroid dapat dikenali secara morfologi. Selanjutnya pematangan akan terjadi di sumsum tulang dimana sel proeritroblast akan menjadi *basophilic normoblast*, *polychromatophilic normoblast*, *orthochromatophilic normoblast*, dan pada akhirnya akan memamatkan diri menjadi retikulosit. Setiap langkah pematangan tersebut akan diikuti dengan perubahan berupa peningkatan jumlah hemoglobin, ukuran menjadi lebih kecil, inti sel menjadi lebih piknotik yang pada akhirnya akan menghilang pada saat sel ini akan dikeluarkan dari sumsum tulang. Retikulosit yang baru dikeluarkan dari sumsum tulang masing mengandung ribosome dan RNA dan masih terus memproduksi hemoglobin. Setelah 1 – 2 hari di darah tepi retikulosit akan kehilangan ribosome dan RNAnya dan akan menjadi sel eritrosit matang.^{8,15}

PERKEMBANGAN DAN PEMATANGAN RETIKULOSIT

Selama proses eritropoiesis sel induk eritrosit yang paling tua atau *late-stage erythroblasts* akan mengalami pematangan dengan menghilangnya inti sehingga menjadi retikulosit. Dalam periode beberapa hari proses pematangan ini ditandai dengan: (1) penyempurnaan pembentukan hemoglobin dan protein lainya seperti halnya SDM yang matang; (2) adanya perubahan bentuk dari besar kelebih kecil, *uniform* dan berbentuk *biconcave discoid*; dan (3) terjadinya degradasi protein plasma dan organel internal serta residual protein lainnya. Bersamaan dengan adanya perubahan intrinsik ini retikulosit akan bermigrasi kesirkulasi darah tepi. Namun demikian populasi retikulosit ini bukanlah sesuatu yang homogen oleh karena adanya tingkatan maturasi yang berbeda dari retikulosit tersebut. Dengan meningkatnya rangsangan eritropoiesis seperti misalnya adanya proses perdarahan atau hemolisis, jumlah dan proporsi dari sel retikulosit muda akan meningkat baik didalam sumsum tulang maupun didarah tepi. Ada perbedaan masa hidup antara retikulosit normal dan retikulosit muda (imatur) yaitu membran retikulosit imatur akan lebih kaku dan tidak stabil, disamping itu retikulosit imatur ini masih mempunyai reseptor untuk protein adesif sedangkan retikulosit normal telah kehilangan reseptor ini begitu sel ini bermigrasi ke perifer.¹⁶ Suatu studi memperkirakan lama waktu tinggal retikulosit disumsum tulang sebelum memasuki sirkulasi darah tepi bervariasi antara 17 jam pada tikus normal sampai 6,5 jam pada tikus yang menderita anemia.¹⁷

Walaupun retikulosit baik di sumsum tulang maupun di darah tepi bisa dipisahkan dari kontaminasi sel yang sama dari kompartemen yang berbeda akan tetapi pemisahan ini tidak sempurna sekali sehingga metode untuk membedakan masih perlu disempurnakan untuk mengetahui dengan tepat fungsi fisiologis dan maturasi dari retikulosit. Diperkirakan



Gambar 2. Erythroid marrow maturation¹⁵

waktu pematangan retikulosit adalah berkisar antara 2 – 5 jam, tergantung metode yang dipakai, spesies yang dipelajari dan juga tingkat stimulasi proses eritropoesis tersebut.¹⁸ Faktor yang menentukan kapan retikulosit keluar dari sumsum tulang ke sirkulasi masih belum jelas diketahui. Ada studi yang mendapatkan bahwa perbedaan spesies dapat menentukan perbedaan jumlah retikulosit yang beredar di darah tepi, dimana pada tikus dan babi didapatkan jumlah retikulosit yang banyak sedang pada manusia, anjing dan kucing jumlahnya sedikit bahkan pada kuda hampir tidak didapatkan atau sedikit sekali. Perbedaan yang unik ini bisa dikenali dengan metode manual dengan pengecatan supravital seperti metode biru metilen.¹³

Retikulosit yang sangat muda (imatur) adalah retikulosit yang dilepaskan ke darah tepi akibat adanya rangsangan akibat anemia dan hal ini disebut *stressed reticulocyte*. Retikulosit jenis ini mempunyai masa hidup *in vivo* yang lebih pendek apabila di transfusikan kedalam resepien normal dan secara umum dianggap sel ini tidak normal karena tidak melalui perkembangan sel yang normal sampai ke divisi terminal dari perkembangan retikulosit. Sebuah studi ingin meneliti masa hidup dari retikulosit normal dan retikulosit *stress* ini baik pada pasien normal maupun pasien anemia. Eksperimen ini mendapatkan data: (1) masa hidup retikulosit akan normal kalau normal retikulosit diinjeksikan ke binatang yang non anemik; (2) oleh karena gangguan

intrinsik dari retikulosit *stress*, akan menyebabkan sel ini lebih cepat dibersihkan dari sirkulasi oleh resepien normal dengan kecepatan yang lebih besar dibandingkan dengan resepien yang anemia; dan (3) baik retikulosit normal maupun retikulosit yang *stress* akan disingkirkan dengan kecepatan yang bertambah dengan berlalunya waktu pada penderita yang anemia. Secara keseluruhan data ini menunjukkan, pada saat proses anemia berjalan akan terjadi proses adaptasi yang memungkinkan sel yang diproduksi selama anemia tersebut akan beredar lebih lama pada binatang yang dibuat anemi dibandingkan dengan binatang yang normal. Studi yang lain juga mendukung hal ini dimana didapatkan bahwa peningkatan masa hidup retikulosit pada binatang yang anemia bukan disebabkan oleh adanya *overload* sistem retikoluendotelial akan tetapi hal ini diduga oleh adanya proses adaptasi lien yang menurunkan aktifitas penghancurannya terhadap retikulosit yang *stress*.^{16,18}

Besi digunakan untuk mensintesis hemoglobin oleh sel induk eritroid di sumsum tulang pada proses eritropoesis yang pada akhirnya bermuara dengan pelepasan retikulosit ke sirkulasi, dan akan memberi sinyal untuk aktivitas eritropoesis 3 – 4 hari setelah besi terpakai untuk membuat hemoglobin. Oleh karena itu CHR dianggap dapat merefleksikan ketersediaan besi selama pembentukan SDM, dan parameter retikulosit ini menggambarkan keseimbangan antara besi dan eritropoesis dalam 28 jam terakhir. Peneliti akhir-akhir ini banyak mengindikasikan bahwa CHR merupakan indikator untuk ketersediaan besi selama pemberian terapi rekombinan eritropoetin manusia. Perubahan kadar hitung retikulosit awal hanyalah menggambarkan keluarnya retikulosit muda dari sumsum tulang dan bukan merupakan tanda adanya ekspansi dari proses eritropoesis dan dengan alasan ini tentu lebih penting untuk mengetahui respon eritropoesis terhadap pemberian besi dibandingkan hanya melihat retikulosit indeks saja. Oleh karena itu juga maka penghitungan retikulosit *immature* berdasarkan kandungan RNANYa dengan flowsitometri akan memberikan informasi yang lebih tepat.^{11,19}

PARAMETER DARI RETIKULOSIT

Dengan metode *flowcytometer* akan memungkinkan pengukuran parameter retikulosit yang lebih banyak diantaranya adalah retikulosit sel volume (MCVr), konsentrasi hemoglobin (MCHCr), dan kandungan hemoglobin rerata (CHr). Pada subyek normal, terapi eritropoetin akan meningkatkan MCVr dan menurunkan MCHCr. Dan dengan kadar serum feritin yang lebih besar dari 100 u/l tidak akan didapatkan adanya retikulosit hipokromik. Pemeriksaan CHr banyak dilakukan pada penderita yang menjalani dialisis. CHr ini menunjukkan sensitifitas 100% dan spesifisitas 80% dan lebih akurat sebagai prediktor untuk mengetahui respon terhadap terapi besi dibandingkan serum feritin atau saturasi transferin. Studi lain menunjukkan dengan *base line* CHr kurang dari 28 pg mempunyai sensitifitas sebesar 78% dan spesifisitas sebesar 71% untuk mendeteksi adanya eritropoiesis *iron-restricted* dibandingkan dengan 50% dan 39% untuk pengukuran parameter biokimia yang biasa.^{6,20}

Demikian pula pada pasien yang menjalani bedah jantung pemberian besi intravena bersama dengan eritropoetin akan menghindari produksi retikulosit yang hipokromik dan CHr masih dalam batas normal. Ada beberapa kondisi yang menyebabkan penurunan kadar CHr. Disamping anemia defisiensi besi (ADB), talasemia alfa dan beta juga menyebabkan retikulosit yang mikro dan hipokromik. Anemia kurang besi bisa dideteksi pada stadium sangat dini dengan menurunnya secara progresif level CHr walaupun indikator dari SDM masih normal namun persediaan besi sudah mulai berkurang sehingga mempengaruhi proses eritropoiesis dan akan menginduksi produksi presentase retikulosit dengan kandungan hemoglobin yang rendah. Beberapa studi terakhir menyimpulkan bahwa CHr merupakan prediktor terkuat untuk ADB pada anak dan dianggap sebagai salah satu alternatif standar diagnosis untuk status kekurangan besi.^{6,20}

Parameter retikulosit yang lain yang bisa dihasilkan oleh analiser otomatis adalah fraksi retikulosit muda (IRF). Retikulosit muda ini berkorelasi dengan tingkat floresensi yang tinggi pada flowsitometer dan ini diakibatkan oleh tingginya kandungan protein RNANYA. Retikulosit muda ini bisa digunakan sebagai indikator aktifitas eritropoietik. Oleh karena pemeriksaan parameter ini kurang spesifik oleh adanya gangguan dan pengaruh leukosit dan juga kesulitan untuk standarisasi, penggunaan klinis dari pemeriksaan IRF masih sangat terbatas. Fraksi retikulosit imatur ini mencerminkan derajat eritropoiesis akan tetapi tidak sebagai indikator adanya eritropoiesis yang *iron-restricted*.²¹

Eritropoiesis inefektif adalah suatu proses penghancuran sel induk eritroid yang prematur disussum tulang. Dalam keadaan normal inefektif eritropoiesis ini terjadi kurang dari 10% akan tetapi pada kasus MDS (*Myelodysplastic Syndrome*), hemoglobinopati, anemia diseritropoetik dan anemia megaloblastik akan dijumpai peningkatan dari proses eritropoiesis inefektif ini. Choi, dkk.²² dalam studinya untuk meneliti besarnya eritropoiesis inefektif ini mendapatkan bahwa pengukuran rasio antara retikulosit di sumsum tulang terhadap retikulosit terkoreksi didarah tepi merupakan ukuran yang penting untuk bisa memperkirakan beratnya gangguan produksi SDM.

PEMERIKSAAN RETIKULOSIT

Pemeriksaan laboratorium untuk memeriksa retikulosit didasarkan pada temuan adanya protein RNA pada sitoplasma dari retikulosit. Sejak tahun 1940 sampai awal 1980 pemeriksaan retikulosit seluruhnya ditentukan dengan pemeriksaan mikroskop pada hapusan darah tepi, dimana retikulosit diwarnai dengan pewarna supravital walaupun metode ini relatif tidak akurat, lambat dan lebih merepotkan. Namun sejak tahun 80an mulai dikembangkan pemeriksaan yang lebih canggih, lebih cepat, lebih akurat yaitu *flowcytometer* yang

menggunakan pewarna yang berfloresensi spesifik dengan RNA. Alat ini dapat menilai tingkat maturasi dari retikulosit dengan menghitung fraksi floresensi dari retikulosit pada masing-masing regio baik pada floresensi rendah, floresensi sedang maupun pada intensitas floresensi tinggi. Tingkat intensitas floresensi dari retikulosit ini secara langsung berkorelasi dengan kuantitas RNA intraseluler dan oleh karenanya dapat mencerminkan fungsi maturitas seluler. Floresensi tinggi dari retikulosit dengan kandungan RNA yang banyak yang disebut sebagai retikulosit imatur dipakai sebagai indikator aktifitas eritropoietik pada beberapa kasus anemia dalam perawatan terapi tertentu. Oleh karena indeks eritrosit tidak bisa memberikan informasi tentang perubahan yang cepat maka dibutuhkan *marker* yang lebih sensitif untuk mendeteksi lebih awal kelainan ADB atau eritropoiesis pada penderita yang mendapatkan eritropoietin yang rekombinan yaitu dengan melihat IRF (retikulosit imatur).^{6,11}

Hitung retikulosit merupakan komponen esensial dari pemeriksaan darah lengkap (CBC = *Complete Blood Count*) dan berperan penting pada klasifikasi jenis anemia. Ada 2 cara untuk menghitung retikulosit di darah tepi. Cara manual yaitu dengan menghitung retikulosit pada gambaran darah tepi yang diwarnai dengan pewarna biru metilen. Pewarna ini akan mengendapkan dan mewarnai RNA sehingga sel retikulosit dapat dikenal diantara sel darah merah matang lainnya dan retikulosit dihitung dengan membandingkan jumlah retikulosit dengan sekitar 1000 sel darah merah. Hasil hitungan ini dinyatakan dalam persentase, yang harga normalnya berkisar antara 1 – 2%. Sedang cara lainnya adalah dengan memakai alat *flowcytometer*. Dengan cara ini disamping hitung retikulosit juga dapat dikenal tingkat pematangan retikulosit yaitu dengan melihat jumlah kandungan RNA dari sel tersebut. Makin banyak jumlah RNA maka makin muda sel retikulosit itu.^{5,7}

Untuk dapat digunakan sebagai alat untuk mengukur tingkat produksi sel darah merah oleh sumsum tulang maka hasil penghitungan retikulosit

tersebut harus dilakukan koreksi terhadap kadar hematokrit pasien yang bersangkutan dan koreksi terhadap efek dari eritropoietin terhadap proses pelepasan retikulosit muda dari sumsum tulang ke darah tepi. Pada kebanyakan laboratorium biasanya secara otomatis dilakukan koreksi dengan jumlah absolut sel darah merah sehingga didapatkan jumlah absolut dari retikulosit, atau dengan mengalikan dengan fraksi hematokrit pasien dengan hematokrit normal (45%) sehingga didapatkan indeks produksi retikulosit (RPI = *Reticulocyte Production Index*). RPI adalah angka yang mencerminkan indeks sebenarnya dari produksi sel darah merah oleh sumsum tulang pada pasien yang menderita anemia.¹⁵

Seperti diketahui pada saat terjadinya anemia maka dengan adanya rangsangan dari eritropoietin maka akan terjadi pengeluaran sel retikulosit muda yang seharusnya belum waktunya dikeluarkan dari sumsum tulang sehingga sel ini akan membutuhkan waktu yang lebih lama untuk pematangannya. Dalam keadaan normal waktu yang dibutuhkan untuk pematangan retikulosit adalah sekitar 2 hari, sedang waktu yang dibutuhkan oleh sel retikulosit yang dirangsang keluar karena eritropoietin (*stress reticulocytes*) biasanya antara 2 – 4 hari tergantung berat ringannya anemia (kadar hematokrit).^{2,15}

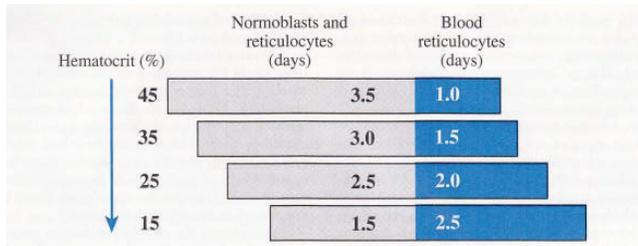
Sebagai contoh misalnya seorang pasien dengan kadar hematokrit 22% ditemukan dengan kadar retikulosit sebesar 6% dengan jumlah sel darah merah absolut $2,6 \times 10,6$ akan mendapatkan:

$$\% \text{ retikulosit} \times (\text{pasien hematokrit}/45) = 6\% \times (22/45) = 3\%$$

persentase retikulosit absolut (*corrected reticulocyte*), atau dengan mengalikan dengan jumlah SDM maka akan didapatkan jumlah retikulosit absolut sebesar $6\% \times 2,6 \times 10,6 = 156,00$ retikulosit/ul.

Koreksi selanjutnya harus dilakukan terhadap waktu pematangan dari retikulosit yang dikeluarkan dari sumsum tulang akibat adanya rangsangan dari hormon eritropoietin pada saat terjadinya anemia. Waktu pematangan ini akan berbeda tergantung kadar

dari hematokrit pasien tersebut, seperti terlihat pada gambar di bawah.



Gambar 3. *Reticulocyte shift*¹⁵

Untuk menghitung indeks produksinya (RPI) maka $6\% \times (22/45) : 2 = 1,5$ dengan catatan pematangan retikulosit dengan hematokrit 22% adalah sekitar 2 hari.

Koreksi terhadap adanya pengeluaran retikulosit yang terlalu muda ini harus dilakukan untuk mendapatkan gambaran produksi SDM yang sebenarnya terjadi di sumsum tulang. Untuk membuktikan adanya peran stres yang dilakukan oleh adanya rangsangan oleh eritropoietin terhadap pelepasan retikulosit muda ini dapat dilakukan dengan memeriksa adanya sel makrosit polikromasi di hapusan darah tepi. Tanpa adanya sel makrosit polikromasi ini maka dapat diasumsikan tidak adanya rangsangan dari eritropoietin.

RPI merupakan ukuran yang sangat akurat untuk mengukur adanya produksi SDM yang efektif. Apabila seorang pasien anemia dengan kadar hematokrit 30% mempunyai RPI sebesar 3 x normal, maka hal ini dapat diartikan bahwa pasien tersebut mempunyai ginjal yang berfungsi normal, respon eritropoietin yang bagus dan fungsi sumsum tulang yang normal. Di samping itu pasien tersebut dapat diduga kuat menderita anemia karena perdarahan atau karena hemolisis. Apabila anemia nya berhubungan dengan adanya gangguan pada proses proliferasi dan maturasi sumsum tulang maka dapat diharapkan RPI nya akan lebih kecil dari 2 yaitu yang disebut sebagai *ineffective erythropoiesis*.^{15,22}

Dengan diketemukannya metode yang lebih canggih dengan pengukuran tingkat floresensi ikatan RNA maka akurasi dan presisi pemeriksaan parameter retikulosit menjadi lebih maksimal. Peningkatan

sensitifitas ini walaupun pada sampel kadar retikulosit yang rendah memungkinkan pemeriksaan parameter retikulosit digunakan sebagai alat bantu diagnostik lebih luas lagi diluar diagnostik penyakit anemia, diantaranya sebagai monitoring proses regenerasi eritroid setelah pemberian kemoterapi atau transplantasi sumsum tulang dan respon eritropoiesis.²³

APLIKASI KLINIS RETIKULOSIT

Retikulositosis (peningkatan jumlah retikulosit yang beredar disirkulasi) secara normal akan terjadi pada pasien-pasien anemi dengan fungsi sumsum tulang yang masih bagus, termasuk pasien-pasien dengan perdarahan atau anemia hemolitik (anemia *sickle cell*, thalasemia, sferositosis, defisiensi G6PD, penyakit hemolitik autoimun, dan hipersplenisme), dan pasien-pasien anemia yang telah berhasil diterapi. Sedangkan pada pasien dengan kelainan sumsum tulang, gangguan eritropoiesis atau penurunan produksi eritropoietin akan didapat jumlah retikulosit yang normal atau menurun (retikulositopenia) walaupun penderita dalam keadaan anemia. Pasien anemia dengan defisiensi besi, asam folat, atau vitamin B12, anemia pernisiiosa, anemia aplastik akibat proses imunologis ataupun obat, leukemia atau proses metastase keganasan, mielofibrosis idiopatik dan kelainan-kelainan lain akan ditemukan dengan retikulositopenia. Perhitungan retikulosit secara akurat adalah sangat penting untuk menegakkan diagnosis penyakit-penyakit kelainan hematologi.^{2,3,24} Perhitungan retikulosit juga memegang peranan penting dalam monitoring progresivitas pasien-pasien yang diberikan terapi konvensional ataupun experimental untuk berbagai jenis penyakit kelainan darah. Selanjutnya pemberian rekombinan eritropoietin dan *growth factor* lainnya yang penting untuk meningkatkan regenerasi sumsum tulang pada pasien yang mendapatkan kemoterapi atau pada pasien yang menjalani transplantasi sumsum tulang perlu untuk dilakukan pemeriksaan kadar retikulosit.^{7,23}

Diagnostik anemia dan kelainan hematologi

Anemia sekunder akibat aplasia sumsum tulang, kelainan nutrisi dan infiltrasi sumsum tulang akan ditandai dengan hitung retikulosit yang sangat rendah ($< 2\%$ retikulosit terkoreksi). Pada pasien-pasien ini, penghitungan retikulosit dengan pengecatan supravital dapat mengkonfirmasi hitung retikulosit yang sangat rendah, tetapi tidak memberikan tambahan informasi untuk diagnostik. Lin, dkk. mengevaluasi penghitungan otomatis retikulosit pada populasi yang cukup besar. Hitung retikulosit yang sangat rendah ($< 0,03 \times 10^{12}/l$) dan fraksi imatur yang sangat rendah ($< 10\%$) sangat khas didapatkan pada pasien anemia aplastik atau megaloblastik, sedangkan pada pasien dengan kelainan infiltrasi sumsum tulang hitung retikulositnya mendekati normal, dengan fraksi imatur yang tinggi ($> 30\%$). Diantara pasien dengan pansitopenia akibat anemia aplastik, kelainan infiltrasi sumsum tulang, hipersplenisme, atau anemia megaloblastik, hitung retikulosit absolut terendah ditemukan pada pasien anemia aplastik dan tertinggi pada pasien dengan hipersplenisme. Hitung retikulosit sumsum tulang dan rasio pergeseran dalam sirkulasi darah tidak memberikan tambahan informasi untuk tujuan klasifikasi anemia. *Reticulocyte mean channel fluorescence* dilaporkan menunjukkan korelasi yang signifikan dengan kapasitas pengikatan besi total (TIBC) ($p < 0,0001$, $r = 0,62$) dan feritin ($p < 0,0001$, $r = 0,40$).²⁵

Nilai klinis dari hitung retikulosit dan RMI (*reticulocyte maturation index*) yang diukur secara *flowcytometer* juga terbukti berperan pada pasien dengan transplantasi ginjal dan pasien dengan anemia akibat berbagai penyebab. Pada anak-anak ditemukan hanya kadar CHr dan hemoglobin yang merupakan prediktor yang signifikan pada anemia defisiensi besi, sedangkan CHr merupakan satu-satunya prediktor multivariat yang signifikan pada anemia defisiensi besi. Nilai CHr 26 pg merupakan titik potong yang optimal pada anemia defisiensi besi berdasar analisis sensitivitas dan spesifisitas.^{6,20}

Anemia hemolitik tanpa retikulositosis ditemukan pada anemia pernisiiosa, hitung retikulosit masih tetap dalam kadar relatif rendah ($< 2 - 3\%$) walaupun ditemukan masa hidup eritrosit yang pendek dan ditandai dengan hiperplasia eritroblastik pada sumsum tulang. Hal ini terjadi pada anemia pernisiiosa oleh karena adanya disinkronisasi antara nukleus dan sitoplasma yang mengakibatkan hilangnya RNA sebelum terjadi pembentukan nukleus. Fenomena ini juga terjadi pada pasien dengan defisiensi asam folat atau pasien defisiensi besi yang terjadi bersamaan dengan anemia hemolitik. Situasi yang berbeda terjadi pada pasien anemia hemolitik autoimun dimana dapat terjadi krisis aplastik yang merupakan kondisi mengancam jiwa, dibandingkan dengan kejadian meningkatnya eritroblas akibat proses destruksi eritroblas melalui reaksi imunologis. Krisis aplastik dengan retikulositopenia juga ditemukan pada kasus infeksi viral, sferositosis herediter, reaksi transfusi hemolitik tipe lambat dan penyakit hemolitik kronik seperti anemia *sickle cell*. IRF yang tinggi dengan peningkatan hitung retikulosit absolut (ARC) menunjukkan adanya eritropoiesis yang meningkat, seperti pada kasus anemia hemolitik didapat atau anemia karena perdarahan akut. Sedangkan IRF yang tinggi dengan ARC normal ataupun rendah ditemukan pada kondisi diseritropoiesis atau inefektif eritropoietik seperti pada kasus leukemia akut, sindrom mielodisplastik, anemia aplastik atau anemia megaloblastik. Maturitas retikulosit normal pada pasien dengan kondisi eritropoiesis menurun seperti pada pasien dengan gagal ginjal kronik dan anemia defisiensi besi.⁷

Monitoring terapi dan respon dari sumsum tulang

Dalam menunjang diagnostik kelainan hematologi, hitung retikulosit juga menjelaskan mengenai derajat aktivitas regeneratif setelah pengobatan pada kasus anemia defisiensi besi, anemia defisiensi asam folat/B12, pemberian kemoterapi, transplantasi sumsum tulang, atau malaria.

Penggunaan klinis parameter retikulosit secara analisa otomatis lebih banyak ditujukan pada pasien-pasien aplasia sumsum tulang akibat kemoterapi, termasuk pasien yang menjalani transplantasi sumsum tulang. Pada pasien-pasien ini, prediksi awal pertumbuhan sumsum tulangnya sangat penting dalam menentukan selanjutnya apakah transplantasi sumsum tulang ini mengalami pertumbuhan yang lambat ataupun gagal. Selama induksi kemoterapi, hitung retikulosit dapat mencapai hingga titik nadir yang sangat ekstrim, dan akan tampak sebagai fraksi imatur retikulosit (*Low Flowcytometri Ratio*). Fraksi retikulosit dengan MFR (*Medium Flowcytometri Ratio*) akan mulai meningkat kira-kira setelah 2 minggu paska kemoterapi, dan selanjutnya akan diikuti dengan fraksi retikulosit dengan HFR (*High Flowcytometri Ratio*) beberapa hari setelahnya.^{7,26}

Beberapa studi pada pasien-pasien yang mengalami aplasia sumsum tulang akibat induksi kemoterapi, dan pada pasien yang menjalani transplantasi sumsum tulang allogenik ataupun autologus, ditemukannya RMI dan proporsi dari *highly fluorescent reticulocytes* merupakan prediktor yang signifikan pada pertumbuhan sumsum tulang. Pada pasien rawat jalan yang menggunakan *growth factors* untuk kepentingan transplantasi sumsum tulang, ternyata peningkatan retikulosit imatur mendahului keluarnya CD34⁺ ke sirkulasi, dengan rentang waktu kira-kira 2 hari. Hal ini menunjukkan bahwa pemeriksaan retikulosit dengan teknik *flowcytometri* akan dapat membantu monitoring untuk mengambil sel induk (*harvested*) untuk keperluan transplantasi. Pada pasien gagal ginjal kronik yang menjalani hemodialisis, pemeriksaan retikulosit secara klinis dipergunakan untuk menegakkan diagnosis anemia defisiensi besi serta untuk kepentingan mengevaluasi pengobatan dengan preparat besi oral, eritropoietin atau agen lain yang diberikan.^{7,26}

PERANAN KLINIS LAIN DARI RETIKULOSIT

Dengan dikenalnya preparat rekombinan eritropoietin, membuka perkembangan bagi pengobatan anemia pada pasien-pasien gagal ginjal kronik. Namun belumbanyak diteliti mengenai penggunaan terapi ruEPO (*recombinant human erythropoietin*) untuk anemia yang terkait dengan penyakit lain dengan kondisi defisiensi eritropoietin relatif atau supresi sumsum tulang, termasuk kanker kemoterapi, transplantasi sumsum tulang, mielodisplasia, prematuritas, perioperatif, anemia yang diinduksi karena zidovudin pada pasien HIV, anemia sel sabit, dan penyakit lainnya. Karena ruEPO dalam mekanismenya merangsang eritropoiesis sangat tergantung pada asupan besi yang baik, maka sangat penting untuk melakukan pemeriksaan status besi, bahkan pemberian ruEPO dilakukan dengan disertai pemberian preparat besi intravena. Pada parameter konvensional, hitung retikulosit biasanya paling banyak digunakan untuk monitoring laboratorium. Tetapi, saat ini sudah banyak digunakan adanya parameter lainnya yang menunjukkan kadar yang lebih akurat mengenai cadangan besi sumsum tulang. Parameter ini antara lain CHR, persentase eritrosit hipokromik dan feritin sel darah merah (RBCFer).^{11,12,19}

Kegunaan lain dari pemeriksaan retikulosit dengan *flowcytometri* termasuk di dalamnya pemeriksaan untuk mencari adanya retikulosit pada sediaan darah beku dan paska transfusi secara *invivo*, dalam hubungannya antara ekspresi CD36 dan stres retikulosit pada pasien dengan anemia sel sabit dan kelainan hemolitik kronik lainnya, serta adanya reaksi retikulosit dengan fraksi IgG dari anti serum membran sel darah merah (reaksi F-IgG dengan RBCs). Penemuan noveltis dari aplikasi pemeriksaan retikulosit adalah untuk mengetahui adanya penyalahgunaan eritropoietin dalam bidang olah raga (*dopping*). Dengan tentunya memperhatikan presisi, akurasi dan determinasi dari nilai hitung retikulosit.^{7,14}

RINGKASAN

Retikulosit adalah sel darah yang masih muda yang dihasilkan sumsum tulang yang mengandung RNA dan beberapa protein organel sel. Sel ini secara bertahap akan kehilangan produksi proteinnya, dan secara normal akan menjadi sel darah merah matur (eritrosit) kira-kira setelah 1 – 2 hari berada dalam darah tepi. Aplikasi klinis dari retikulosit makin meluas lagi setelah ditemukan *automated analyzer* yang mampu melakukan pemeriksaan beberapa parameter retikulosit baru antara lain fraksi retikulosit imatur (IFR), volume rerata retikulosit (MCVr), dan rerata hemoglobin dalam retikulosit (CHr). Metoda *flowcytometer* dilakukan berdasarkan pengukuran tingkat fluoresensi dari pengecatan khusus yang mengikat RNA dengan fluorokrom. Metoda ini meningkatkan presisi dan akurasi pemeriksaan retikulosit. Karena jumlah dan karakteristik retikulosit juga merefleksikan aktifitas sumsum tulang, maka pemeriksaan retikulosit menjadi salah satu pemeriksaan dasar yang penting untuk penatalaksanaan klinis beberapa penyakit. Pemeriksaan beberapa parameter baru dari retikulosit banyak dipergunakan untuk menegakkan berbagai jenis anemia pada kondisi klinis yang baru, seperti monitoring terhadap regenerasi eritroid setelah pemberian kemoterapi atau transplantasi sumsum tulang serta mengetahui respon eritropoiesis setelah pemberian terapi eritropoietin.

DAFTAR RUJUKAN

1. Escobar MC, Rappaport ES, Tipton P, Balentine P. Reticulocyte estimate from peripheral blood smear: a simple, fast, and economical method for evaluation of anemia. *Laboratory Medicine* 2002;33:703-5.
2. Dessypris EN. Erythropoiesis. In: Greer JP, Foerster J, Rodgers GM, Paraskevas F, Glader, Arber DA, et al, editors. *Wintrobe's clinical hematology*. 12th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2003.p.169-90.
3. Erslev AJ. Production of erythrocytes. In: Beutler E, Coller BS, Lichtman M, Kipps T, Seligsohn U, editors. *Williams hematology*. 6th ed. New York: McGraw-Hill; 2001.p.389-98.
4. Canals C, Remacha AF, Sarda MP. Clinical utility of the new Sysmex XE 2010 parameter reticulocyte hemoglobin equivalent in the diagnosis of anemia. *Haematologica* 2005; 190:133-44.
5. Buttarello M, Temporin V, Ceravolo R, Farina G, Bulian P. The new reticulocyte parameter (RET-Y) of the Sysmex XE 2010. Its use in the diagnosis and monitoring of posttreatment sideropenic anemia. *Am J Clin Pathol* 2004;121:489-95.
6. Brugnara C, Zurakowski D, DiCanzio J, Boyd T, Platt O. Reticulocyte hemoglobin content to diagnose iron deficiency in children. *JAMA* 1999;281:2225-30.
7. Riley RS, Ben-Ezra JM, Tidwell Ann. Reticulocyte enumeration: past & present. *Laboratory Medicine* 2001;32:599-608.
8. Sullivan R. Erythropoiesis and red cell physiology. Available from: [http:// www.bcm.edu/medicine/heme.onc/](http://www.bcm.edu/medicine/heme.onc/). Accessed on: 15th June 2010.
9. Handin RI, Lux IV SE, Stossel TP. *Blood principles and practice of hematology*. 2nd ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2003.p.57-63.
10. Chang KH, Tam M, Stevenson MM. Inappropriately low reticulocytosis in severe malarial anemia correlates with suppression in the development of late erythroid precursors. *Blood* 2004;103:3727-36.
11. Cullen P, Soffker J, Hopfl M, Bremer C, Schlaghecken R, Mehrens T, et al. Hypochromic red cells and reticulocyte haemoglobin content as markers of iron-deficient erythropoiesis in patients undergoing chronic haemodialysis. *Nephrol Dial Transplant* 1999;14:659-65.

12. Kestenbaurn B, Kimmel PL. Reevaluating erythropoiesis-stimulating agents. *N Eng J Med* 2010; 362:1742-44.
13. Cooper C, Sears W, Bienzle D. Reticulocyte change after experimental anemia and erythropoietin treatment of horses. *Journal of Applied Physiology* 2005; 99:915-21.
14. Ashenden MJ, Sharpe K, Damsgaard R, Jarvis L. Standardization of Reticulocyte Values in an Antidoping Context. *Am J Clin Pathol* 2004;121:816-25.
15. Hilman RS, Ault KA. Clinical approach to anemia. *Hematology in clinical practice*. 3ed. New York: McGraw-Hill; 2002.p.12-26.
16. Noble NA, Xu QP, Hege LL. Reticulocytes II: reexamination of the in vivo survival of stress reticulocytes. *Blood* 1990;75:1877-82.
17. Tarbutt MG. Cell population kinetics of the erythroid system in rat: the response to protracted anemia and to continuous gamma-irradiation. *Br J Haematol* 1989;16:9-24.
18. Koury MJ, Koury ST, Kopsombut P, Bondurant MC. In vitro maturation of nascent reticulocytes to erythrocytes. *Blood* 2005;1035:2168-76.
19. Chuang CL, Liu RS, Wei YH, Huang TP, Tarng DC. Early prediction of response to intravenous iron supplementation reticulocyte count in haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant* 2003;18:370-77.
20. Mast AE, Blinder MA, Lu Q, Fiix S, Dietzen DJ. Clinical utility of the reticulocyte hemoglobin content in the diagnosis of iron deficiency. *Blood* 2002; 99:1489-93.
21. Goodnough LT, Skikne B, Brugnara C. Erythropoietin, iron, and erythropoiesis. *Blood* 2000;96:823-39
22. Choi JW. Ratio of Bone Marrow Reticulocytes to Peripheral Corrected Reticulocytes for Evaluating Ineffective Erythropoiesis. *Annals of Clinical & Laboratory Science* 2006;36:439-41.
23. D'Onofrio G, Chirillo R, Zini G, Caenaro G, Tommasi M, Micciulli G. Simultaneous Measurement of Reticulocyte and Red Blood Cell Indices in Healthy Subjects and Patients With Microcytic and Macrocytic Anemia. *Blood* 1995;85:818-23.
24. Sandhaus LM, Meyer P. How Useful Are CBC and Reticulocyte Reports to Clinicians. *Am J Clin Pathol* 2002;118:787-93.
25. Wells DA, Daegneault-Crek CA, Smirel CR. Effect of iron status on reticulocyte mean channel fluorescence. *Am J Clin Pathol* 1992;97:120-34.
26. Sica S, Sora F, Laurentz L. Highly fluorescence reticulocyte count predict hemopoietic recovery after immunosuppression for severe aplastic anemia. *Clin Lab Haematol* 1999;21:387-99.