

APOPTOSIS DAN NEKROSIS PADA BERBAGAI SELULARITAS SUMSUM TULANG

Studi pada aspirat sumsum tulang dari penderita dengan gangguan hematopoiesis

APOPTOSIS AND NECROSIS AT VARIOUS MARROW CELLULARITY

Study at marrow aspirate from patient with hematopoietic disorders

Edi Widjajanto

Laboratorium Patologi Klinik, Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya – RSU Dr. Saiful Anwar, Malang
Program Studi Biomedik, Program Pascasarjana, Universitas Brawijaya, Malang

ABSTRACT

Marrow cellularity determined by homeostatic balance of proliferation, differentiation and cell death (apoptosis and necrosis) of hematopoietic cells. Hematopoietic malignancy relate to arrest of cell differentiation, and hyperproliferation of hematopoietic cells that cause marrow hypercellularity, while aplastic anemia relate to hyperapoptosis of hematopoietic cells lead to marrow hypocellularity. This study reveals that degree of apoptosis and necrosis of hematopoietic cell were characteristically difference at various marrow cellularity. Samples taken from various patient with hematopoietic disorders ($n = 60$) were examined microscopically. Marrow cellularity and counting of apoptotic and necrotic cells were conducted on imprint of marrow particle, colored with toluidin blue and Wright's stain. Statistical analysis (Anova) indicate that the amount of apoptosis at hypocellular ($n 9$), normocellular ($n 27$) and hypercellular marrow ($n 24$) were 3.63 ± 1.77 ; 1.71 ± 1.97 and 0.65 ± 0.72 % ($p 0.001$) respectively, while amount of necrotic cells were similar ($p 0.728$), apoptosis / necrosis ratio were 3.80 ± 3.93 ; 1.19 ± 1.65 and 1.06 ± 2.15 ($p 0.05$). These results demonstrate that apoptosis more happened at hypocellular marrow compared to normocellular and hypercellular marrow.

Key words: Cell death, Apoptosis, Necrosis, Marrow Cellularity

ABSTRAK

Selularitas sumsum tulang ditentukan oleh keseimbangan proliferasi, diferensiasi dan kematian sel (apoptosis dan nekrosis) dari sel hematopoietik. Keganasan sistem hematopoiesis berkaitan dengan hiperproliferasi dan gangguan diferensiasi sel hematopoietik serta sumsum tulang hiperseluler, sedangkan anemia aplastik berkaitan dengan hiperapoptosis dan sumsum tulang hiposeluler. Studi ini meneliti distribusi apoptosis dan nekrosis dari sel hematopoietik pada berbagai derajat selularitas sumsum tulang, dari berbagai penderita dengan hematopoiesis yang terganggu ($n = 60$). Secara mikroskopik, dari sedimen (marrow imprint) aspirat sumsum tulang dengan pewarnaan Toluidin blue dan Wright ditentukan selularitas sumsum tulang serta jumlah sel hematopoietik yang mengalami apoptosis dan nekrosis. Analisa statistik cara Anova menunjukkan bahwa jumlah apoptosis pada sumsum tulang hiposeluler ($n 9$), normoseluler ($n 27$) dan hiperseluler ($n 24$) masing-masing adalah $3,63 \pm 1,77$; $1,71 \pm 1,97$ dan $0,65 \pm 0,72$ % ($p 0,001$), sedangkan sel nekrotik jumlahnya sama ($p 0,728$), tetapi rasio apoptosis/nekrosisnya $3,80 \pm 3,93$; $1,19 \pm 1,65$ dan $1,06 \pm 2,15$ ($p 0,05$). Hal tersebut menunjukkan bahwa apoptosis dari sel hematopoietik lebih banyak terjadi pada sumsum tulang hiposeluler dibanding dengan sumsum tulang normoseluler dan hiperseluler.

Kata kunci: Kematian sel, Apoptosis, Nekrosis, Selularitas Sumsum Tulang

PENDAHULUAN

Sumsum tulang merupakan organ yang sangat aktif, granulopoiesis dan eritropoiesis pada pria dewasa menghasilkan granulosit dan eritrosit, masing-masing sekitar 70 juta dan 200 juta sel setiap hari, dalam seumur hidup diproduksi sel darah hampir 10 kali berat badan (1,2). Integritas fungsi suatu organ ditentukan oleh homeostasis proliferasi, diferensiasi dan kematian dari sel penyusun organ yang bersangkutan (3,4). Dalam hematopoiesis, integritas tersebut ditentukan oleh keseimbangan antara proliferasi, diferensiasi dan kematian sel dari hematopoietic stem cell (HSC) dengan lingkungan mikro (microenvironment) tempat tumbuhnya HSC (2,5,6).

Gangguan proses hematopoiesis dapat berkaitan dengan gangguan proliferasi, diferensiasi atau gangguan kematian sel

hematopoietik (HSC). Pada leukemia terjadi hambatan diferensiasi HSC dan peningkatan proliferasi HSC secara tidak terkendali. Pada sindroma mielodisplastik (MDS) terjadi hambatan pada proses diferensiasi dan maturasi dari HSC, sedangkan pada sindroma mieloproliferatif terjadi percepatan proliferasi HSC. Berbagai gangguan hematopoiesis tersebut di atas berkaitan dengan hiperselularitas sumsum tulang (7). Gangguan hematopoiesis dengan sumsum tulang hiposeluler pada anemia aplastik berkaitan dengan peningkatan kematian sel hematopoietik (8,9).

Pada dasarnya apoptosis dan nekrosis merupakan kutub dari suatu continuum of cell death. Apoptosis merupakan active cell death (energy dependent) sedangkan nekrosis merupakan passive cell death (energy independent). Tampaknya kecukupan

energi (ATP, *adenosine triphosphate*) menentukan pola kematian sel. Ketersediaan energi minimal memungkinkan terjadinya apoptosis, sedangkan ketidaktersediaan energi mendorong terjadinya nekrosis (10,11,12). Pada keganasan terjadi hiperproliferasi disertai peningkatan konsumsi energi (11,13). Melalui studi ini ingin diungkapkan bagaimana frekuensi apoptosis dan nekrosis pada berbagai selularitas sumsum tulang, yang berasal dari berbagai penderita dengan gangguan pada hematopoiesis.

MATERI DAN METODE

Untuk membedakan frekuensi terjadinya apoptosis dan nekrosis pada berbagai derajat selularitas sumsum tulang manusia, dirancang suatu penelitian observasional (non-eksperimental) dengan data yang bersifat *cross sectional*.

Populasi dan sampel

Populasi penelitian adalah penderita dengan hematopoiesis yang terganggu, yang menjalani aspirasi sumsum tulang di RSU. Dr. Saiful Anwar, dan berbagai RS di Kotamadya Malang. Sampel penelitian dipilih dari anggota populasi yang memenuhi kriteria inklusi serta memperhatikan kriteria eksklusi, dan setuju untuk menjadi subyek penelitian. Kriteria inklusi meliputi (i) menyetujui *informed consent* dan bersedia dilakukan aspirasi, (ii) penderita pria maupun wanita (iii) tidak ada kontra indikasi atas dilakukannya aspirasi sumsum tulang misalnya gangguan faal hemostasis, (iv) aspirasi sumsum tulang yang dilakukan adalah yang pertama kali, bukan ulangan untuk evaluasi hasil pengobatan atau tindakan misalnya radiasi. Kriteria eksklusi meliputi (i) tidak bersedia, (ii) terdapat kontra indikasi, (iii) mengkonsumsi obat yang menyebabkan hiposelularitas sumsum tulang misalnya khloramfenikol, fenilbutason, dan obat imunosupresan, (iv) penderita yang sedang dalam pengobatan radiasi.

Besar sampel ditetapkan sebanyak 60 penderita, berdasarkan rumus berikut. Jumlah sampel untuk sumsum tulang hiposeluler 9, normoseluler 27 dan hiperseluler 24 penderita.

$$n = \frac{(Z\alpha)^2 (s)^2}{d^2}$$

n adalah perkiraan besar sampel

$Z\alpha$ pada α 0,05 adalah 1,96

s adalah simpangan baku untuk jumlah mastosit pada masing masing sumsum tulang hipo, normo dan hiperseluler.

d adalah *degree of reliability*.

Selularitas sumsum tulang

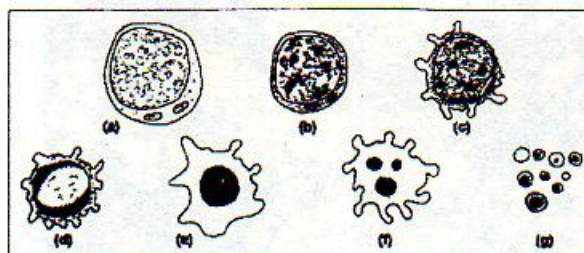
Pemeriksaan selularitas sumsum tulang dilakukan baik secara kualitatif (semikuantitatif) maupun kuantitatif, menggunakan mikroskop sinar. Penilaian selularitas sumsum tulang secara kualitatif dilakukan secara mikroskopik pada sediaan *marrow particle* dari aspirat sumsum tulang. Sumsum tulang diklasifikasikan sebagai hipo-, normo- atau hiperseluler apabila rasio jaringan hematopoietik terhadap seluruh jaringan *marrow* pada *marrow particle* besarnya $< 1/4$, $1/4 - 1/2$, atau $> 1/2$ (14,15). Penilaian selularitas sumsum tulang secara kuantitatif dilakukan dengan menghitung jumlah absolut sel berinti (*nucleated cells*) dalam yang terdapat dalam volume aspirat

sumsum tulang. Penghitungan dilakukan dengan prinsip kamar hitung *improved Neubauer* (16,17). Berdasarkan penelitian terdahulu, jumlah sel sumsum tulang (*nucleated cells*) pada sumsum tulang hipo-, normo-, dan hiperseluler (kualitatif), masing-masing adalah < 52.000 , $52.000 - 79.000$, dan > 79.000 sel/Cmm (18).

Sel limfoid, apoptosis dan nekrosis

Pengamatan untuk menilai sel limfoid, sel apoptosis dan sel nekrosis dilakukan secara mikroskopik pada sediaan tekan (*imprint*) aspirat sumsum tulang yang diwarnai dengan cara *Wright* (19). Secara mikroskopik morfologi *haematopoietic stem cell* (HSC) atau sel induk hematopoiesis (SIH) menyerupai limfosit (1,20). Atas dasar itu maka pada penelitian ini baik limfosit maupun sel yang menyerupai limfosit (HSC) semuanya dihitung dan disebut sebagai sel limfoid, dengan asumsi bahwa dengan cara ini terhitung juga HSC.

Sel limfoid apoptosis dinilai secara mikroskopik, dan ditentukan jumlah proporsinya (%) terhadap seluruh sel berinti yang terdapat pada sediaan. Morfologi sel limfoid yang apoptosis dibedakan terhadap sel yang normal berdasarkan kriteria yang ditetapkan oleh Cohen, gambar 1 (21). Sel nekrotik ditandai oleh gambaran pembesaran ukuran akibat pembengkakan masa sel, disertai kekeruhan (*degenerasi*) masa inti dan seluruh asal sel, serta terjadi disintegrasi membran sel, sehingga terjadi kebocoran sel (3).



Gambar 1. Sel limfoid apoptosis (21)

Secara umum, makin berlanjut proses apoptosis ukuran sel makin bertambah kecil, terjadi pengkerutan pada seluruh bagian sel, membran sel keriput tetapi tetap *intact* (utuh, tidak pecah), sampai akhirnya seluruh sel terfragmentasi sebagai *apoptotic bodies* dan difagositosis oleh makrofag.

- Sel normal; sejumlah kecil sitoplasma (rasio inti: sitoplasma relatif besar), gambaran kromatin di dalam inti sel homogen (tingkat heterogenitas kondensasi kromatin dalam batas normal).
- Sel apoptosis; volume sel berkurang (ukuran sel mengecil, *minimal shrinkage*), organel di sitoplasma terkondensasi (*packed*), kromatin terkondensasi (*clumping*), membran sel masih relatif utuh (*intact*).
- Sel apoptosis; membran sel mengkerut (*ruffled*), menggelembung (*blebbing*), kondensasi kromatin, secara keseluruhan sel mengkerut (*cell shrinkage*).
- Sel apoptosis; kromatin kolaps dan terkondensasi di bagian dalam membran inti sel (*collapse down along the nuclear envelope, crescent*), *membrane cell blebbing*.
- Sel apoptosis; nukleus terkondensasi dan kolaps sebagai suatu masa (*black hole*), *membrane cell blebbing*.

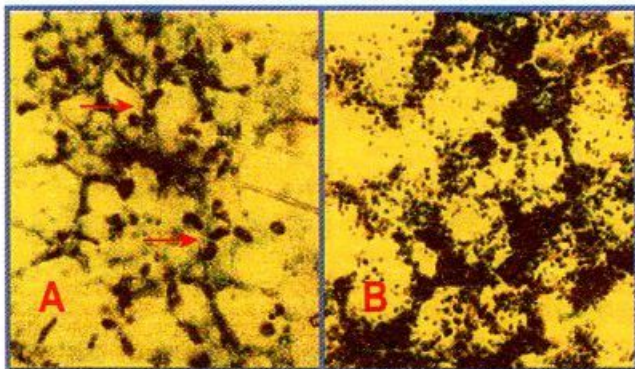
- f. Sel apoptosis; masa inti kolaps dan terfragmentasi menjadi beberapa masa yang lebih kecil (*fragmentation*).
- g. Sel apoptosis; sekelompok *apoptotic bodies*, perhatikan setiap *apoptotic bodies* masih terselubungi oleh membran sel yang utuh (sehingga tidak ada kebocoran sel).

Analisis statistik

Dalam kurun waktu 9 bulan terkumpul 9 sampel dari sumsum tulang hiposeluler, 27 sampel dari sumsum tulang normoseluler dan 24 sampel dari sumsum tulang hiper seluler. Terhadap ketiga kelompok sampel tersebut di uji kemaknaan beda jumlah sel sumsum tulangnya, perbedaan jumlah sel limfoid apoptosis, nekrosis, baik dalam bentuk perbedaan proporsi maupun perbedaan jumlah absolutnya, dengan ANOVA.

HASIL

Pada gambar-2, tampak stroma sumsum tulang hiposeluler yang miskin sel hematopoitik, sinusoid kosong seolah tidak berpenghuni (A), sedangkan pada sumsum tulang yang normoseluler atau hiperseluler sinusoidnya dipadati oleh sel hematopoitik (B). Pewarnaan menggunakan *toluidin blue* 1%, memungkinkan melihat sel metakromatik seperti mastosit (*mast cells*) atau basofil, yang tampak sebagai sel yang berwarna merah-coklat (A, tanda →). Warna tersebut berasal dari granula metakromatik yang dikandungnya.



Gambar 2. Selularitas sumsum tulang
(*Toluidin blue stain, 150 x*)

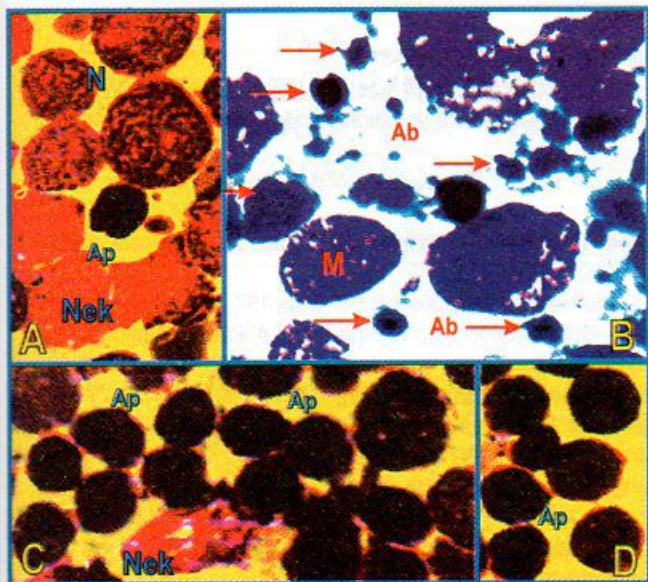
- A. Sumsum tulang hiposeluler, tampak sinusoid sumsum tulang yang kosong tidak terisi atau sangat sedikit terisi oleh sel hematopoitik (sel sumsum tulang). Tampak mastosit pada sumsum tulang hiposeluler (→).
- B. Sumsum tulang normoseluler sampai hiperseluler, tampak sinusoid sumsum tulang yang terisi penuh atau hampir penuh oleh sel hematopoitik (sel sumsum tulang).

Gambar-3 dan tabel-1 menunjukkan berbagai bentuk kematian sel yang terdapat di dalam sumsum tulang, yang diamati secara mikroskopik. Sumsum tulang hiposeluler dari 9 orang penderita anemia aplastik menunjukkan peningkatan jumlah sel limfoid yang mengalami apoptosis ($3,63 \pm 1,77$ %), dibanding sel limfoid sumsum tulang normoseluler ($1,71 \pm 1,97$ %) atau hiperseluler ($0,65 \pm 0,72$ %) dari penderita lekemi dan sejenisnya (p 0,001). Meskipun pada sumsum tulang hiposeluler juga menunjukkan adanya sel limfoid yang nekrotik, tetapi peningkatannya tidak signifikan (p 0,728).

Tabel 1. Apoptosis dan nekrosis dari sel limfoid serta kuantitas sel sumsum tulang pada berbagai selularitas sumsum tulang

	Selularitas sumsum tulang (kualitatif)			Anova
	Hipo seluler (n 9)	Normo seluler (n 27)	Hiper seluler (n 24)	
Apoptosis (%) [x (sd)]	3,63 (1,77)	1,71 (1,97)	0,65 (0,72)	p 0,001
Apoptosis (/Cmm) [x (sd)]	521,85 (364,6)	869,57 (909,9)	538,82 (360,4)	p 0,188
Nekrosis (%) [x (sd)]	1,72 (1,44)	2,52 (2,16)	2,03 (1,94)	p 0,728
Nekrosis (/Cmm) [x (sd)]	258,24 (242,7)	1750,3 (1975,9)	2245,7 (2198,8)	p 0,118
Rasio Apoptosis/ Nekrosis	3,80 (3,93)	1,19 (1,65)	1,06 (2,15)	p 0,050
Sel sumsum tulang (/Cmm) [x (sd)]	16.936,11 (15899,46)	75.860,28 (67344,02)	140.242,90 (129165,20)	p 0,019

Pada sumsum tulang hiposeluler proporsi sel limfoid yang mengalami apoptosis jumlahnya lebih banyak dibanding jumlah yang didapatkan, baik pada sumsum tulang normoseluler maupun sumsum tulang hiperseluler, meskipun secara absolut tidak ada perbedaan. Jumlah sel limfoid yang mengalami nekrosis juga tidak menunjukkan perbedaan yang bermakna pada ketiga jenis selularitas sumsum tulang. Rasio apoptosis/nekrosis pada sumsum tulang hiposeluler lebih tinggi dibanding yang terdapat pada sumsum tulang normoseluler dan hiperseluler (tabel 1).



Gambar 3. Apoptosis dan nekrosis sel limfoid di sumsum tulang manusia (Wright's stain, 1500 x)

- Sel limfoid yang apoptotik (Ap), dikelilingi sel limfoid nekrosis (Nek) dan sel limfoid normal (N).
- Apoptotic bodies (Ab) tampak dikerumuni makrofag (M), sebagai fagosit (*scavenger cells*).
- Kelompok sel limfoid yang apoptotik (Ap), tampak satu sel yang nekrotik (Nek).
- Kelompok sel limfoid apoptotik (Ap).

Perhatikan dan bedakan. Pada sel yang apoptotik (Ap) kromatinnya mengalami kondensasi, besaran sel dan seluruh struktur sel mengkerut (*shrinkage*) sehingga sel mengecil, dengan membrane sel yang relatif *intact*. Pada sel yang nekrotik (Nek) cenderung membengkak (*swelling*) secara merata (*diffuse*), dengan membrane sel kabur.

PEMBAHASAN

Penelitian ini menunjukkan bahwa kematian sel limfoid secara apoptosis banyak didapatkan pada sumsum tulang hiposeluler, sedangkan kematian secara nekrosis banyak pada sumsum tulang hiperseluler. Hal ini mengisyaratkan bahwa hiposelularitas yang terjadi pada penderita anemia aplastik yang diteliti berkaitan dengan peningkatan apoptosis dari sel hematopoietik (HSC). Meskipun terdapat kematian secara nekrosis pada sumsum tulang hiposeluler tetapi proporsinya sama dengan yang didapatkan pada sumsum tulang normo dan hiperseluler. Tingginya rasio apoptosis/nekrosis pada sel limfoid merupakan isyarat bahwa kematian sel hematopoietik secara apoptosis berperan penting pada patogenesis hiposelularitas sumsum tulang pada anemia aplastik.

Pada tabel – 1 tampak bahwa penghitungan jumlah sel limfoid apoptosis secara proporsional (%) terhadap seluruh sel berinti di sumsum tulang memberikan hasil yang signifikan ($p < 0,001$) sedangkan penghitungan secara absolut (sel/Cmm) tidak signifikan ($p > 0,188$). Hal ini merupakan isyarat bahwa interaksi antara sel limfoid dengan berbagai jenis sel lainnya di dalam

sumsum tulang berperan penting dalam proses hematopoiesis. Hal tersebut sejalan dengan peranan lingkungan mikro di sekitar sel hematopoietik (HSC), sebagai penghasil berbagai faktor pertumbuhan dan sitokin yang sangat diperlukan untuk proliferasi dan diferensiasi dari HSC. Menurut Mayani *et al.* lingkungan mikro (*microenvironment*) terdiri dari sel stroma (fibroblast, makrofag, endotel, dan adiposit), sel asesori (*accessory cells*; limfosit T dan monosit) dan matriks ekstra seluler serta sitokin dan *soluble mediator* lainnya (22).

Berbagai mediator yang disintesis oleh fibroblas antara lain interleukin (IL-1, IL-6, IL-7, IL-8), *growth factor* (M-CSF, G-CSF, GM-CSF, SCF) dan IFN- β . Mediator yang disintesis oleh monosit-makrofag antara lain interleukin (IL-1, IL-6), *growth factor* (G-CSF, GM-CSF, M-CSF, PDGF), IFN- α , TNF- α dan TGF- β . Limfosit T mensintesis interleukin (IL-1, IL-6, IL-9, IL-10), *growth factor* (GM-CSF, LIF) dan TNF- α . Tampak bahwa berbagai macam mediator disintesis oleh beberapa jenis sel, secara tumpang-tindih. Kompleksitas ini juga terjadi pada mekanisme kerja berbagai mediator tersebut dalam mempengaruhi proliferasi, diferensiasi dan kematian *stem cell* (9,20,22).

Sebagaimana telah disebutkan di atas, homeostasis pertumbuhan suatu jaringan ditentukan oleh keseimbangan dinamik antara proliferasi, diferensiasi dan kematian sel (apoptosis) dengan sel penyusun jaringan tersebut (3). Sejalan dengan hal tersebut maka patut dipikirkan bahwa hematopoiesis di dalam sumsum tulang juga ditentukan oleh dinamika dari interaksi antara sel hematopoietik dengan berbagai sel penyusun lingkungan mikro di sekitarnya.

Pentingnya peranan lingkungan mikro dalam mempengaruhi pertumbuhan *stem cell* antara lain tampak pada berbagai penelitian tentang *osteoclastogenesis* berikut. Secara *in vitro* terbukti bahwa TGF- β menghambat *osteoclastogenesis* melalui efek stimulasi sintesis osteoprotegerin (suatu *osteoclastogenesis inhibitory factor*) oleh sel stroma sumsum tulang (23). Selain itu juga telah dapat diidentifikasi gen penyandi *osteoclast differentiating factor* (ODF) dan terbukti bahwa vitamin C mempengaruhi kerja ODF dalam *osteoclastogenesis* (24). Selain vitamin C ternyata estrogen juga berperan dalam keseimbangan pada diferensiasi dan aktivasi *osteoclast* (25).

Berbagai uraian di atas menunjukkan pentingnya homeostasis interaksi berbagai sel penyusun lingkungan mikro melalui berbagai mediator yang disintesis. Dari penelitian ini disimpulkan bahwa kematian sel hematopoietik secara apoptosis lebih banyak terjadi pada sumsum tulang hiposeluler dibanding pada sumsum tulang normo dan hiperseluler, sedangkan nekrosis tidak berbeda. Tingginya proporsi sel limfoid (HSC) yang mengalami apoptosis pada sumsum tulang hiposeluler mungkin berkaitan dengan stimulasi proses apoptosis, melalui berbagai mediator yang disintesis oleh sel di lingkungan mikro.

DAFTAR KEPUSTAKAAN

1. Wickramasinghe, N.S., Human Bone Marrow. London: Blackwell Scientific Publication. 1975: 61-81.
2. Hampson, L., Dexter, T.M., Hampson, T.N., The Biology of Hematopoiesis. In (McArthur JR, Lee SH, Wong JEL, Ong YW, eds). Haemathology 1996; Education program of 26th congress of the international society of haematology, Singapore 25 – 29 August 1996. Singapore. Panace Design. 1996: 399 – 404.
3. Cotran, R.S., Kumar, V., Robin, S.L., Robin's Pathologic Basis of Disease. 5th edition. Philadelphia: W.B. Saunders Company. 1994: 1 – 92.
4. Cotran, R.S., Kumar, V., Collins, T., Robin's Pathologic Basis of Disease. 6th edition. Philadelphia: W.B. Saunders Company. 1999: 89 – 112.
5. Qusenberry, P., Levit, L., Hematopoietic Stem Cells, first of three parts. The New England Journal Medicine. 1979: 301: 755 – 760.
6. Bertheault-Cvitkovic, F., Fandi, A., Rouesse, J., Breast Cancer, The Role of Haematopoietic Growth Factors. Besel: F.Hoffmann-La Roche Ltd. 1995: 43-50.
7. Sawyers, C.I., Denny, Wite, O.N., Leukemia and The Disruption of Normal Hematopoiesis. Cell. 1992: 64: 337-350
8. Young, N.S., Alter, B.P., Aplastic Anaemia Acquired and Herited. Philadelphia: W.B. Saunders Company. 1994: 32-100.
9. Young, N.S., The Patophysiology of Acquired Aplastic Anaemia. In (McArthur JR, Lee SH, Wong JEL, Ong YW, eds). Haemathology 1996; Education program of 26th congress of the international society of haematology, Singapore 25 – 29 August 1996. Singapore. Panace Design. 1996: 381- 384.
10. Majno, G., Joris, I., Apoptosis, Oncosis, and Necrosis An overview of Cel Death. Am J Pathol. 1995: 146: 3 – 15.
11. Green, D.R., Reed, J.C., Mitochondria and Apoptosis. Science. 1998: 281: 1305 – 1312.
12. Halestrap, A., Mitochondria and Cell Death; Execution Through A Pore. The Biochemist. 2000: 2: 19 – 24.
13. Brittin, M., Brecher, G., Appearance of Bone Marrow Smears With Necrotic Tumor Cells. Blood. 1971: 38: 229 – 231.
14. Dacie, J.V., Lewis, S.M., Practical Haematology. 5th edition, London. The ELBS and Churchill Livingstone. 1975: 150 – 168.
15. Rothenstein, G., Origin and Development of Blood and Blood Forming Tissue. In (Lee GR, Bithell TC, Foester J, Athens JW, Lukens JN, eds). Wintrobe's Clinical Hematology, 9th edition, Philadelphia: Lea & Febiger. 1993: 41 – 78.
16. Seiverd, C.E., Hematology For Medical Technologist. 4th edition, Philadelphia. Lea & Febiger. 1977: 91 – 142.
17. Brown, B.A., Hematology: Principle and Procedures. 3th edition, Philadelphia. Lea & Febiger. 1980: 75 – 81.
18. Widjajanto, E., Budiman, Kuantifikasi Selularitas Sumsum Tulang. Unpublished. 1996.
19. Undritz, E., Sandoz Atlas of Haematology, 2nd edition, Basle, Sandoz LTD. 1974: 9-41.
20. Young, N.S., Maciejewsky, J., The Patophysiology of Acquired Aplastic Anemia. The New England Journal of Medicine. 1997: 336: 1365 – 1372.
21. Cohen, J.J., Apoptosis. Immunology Today. 1993: 14: 126 – 130.
22. Mayani, H., Guilbert, L.J., Janowska-Wieczoreck, A., Biology of Hematopoietic Microenvironment. Eur J Haematol. 1992 49: 225 – 233.
23. Takai, H., *et al.*, Transforming Growth Factor β Stimulates the Production of Osteoprotegerin / Osteoclastogenesis Inhibitory Factor by Bone Marrow Stromal Cells. J Biol Chem. 1998: 273: 27091– 27096.
24. Otsuka, E., *et al.*, Characterization of Osteoclastic Differentiation of Stromal Cell Line ST2 That Is Induced by Ascorbic Acid. Am J Physiol Cell Physiol. 2000: 277: C132 – C138.
25. Boyle, W.J., Simonet, W.S., Lacey, D.L., Osteoclast Differentiation and Activation. Nature. 2003: 423: 337–342.
26. Bosiela, A.W.A., Identification and Counting of Basophil Leucocytes. Stain Technology. 1959: 34: 335–338.
27. Cohen, G., Protein-protein Interaction in The Initiation of Caspase Activation in The Apoptosis. The Biochemist. 2000: 22: 25 – 27.
28. Sawyers, C.I., Denny, Wite, O.N., Leukemia and The Disruption of Normal Hematopoiesis. Cell. 1991: 64: 337–350.