

APLIKASI *FLOW CYTOMETRY* DALAM BIDANG IMUNOLOGI: REVIEW

Munir Alinu Mulki^{1*}, Tiana Milanda¹, Melisa Intan Barliana^{1,2}

¹Departemen Biologi Farmasi, Fakultas Farmasi, Universitas Padjadjaran, Jl. Raya Bandung Sumedang KM 21, Jatinangor 45363, Telepon (022)7796200, Faksimile (022)7796200

²Pusat Unggulan Iptek Perguruan Tinggi, Inovasi Pelayanan Kefarmasian, Universitas Padjadjaran

*corresponding author: muniralimulki@gmail.com

ABSTRAK

Flow cytometry merupakan suatu instrumen canggih yang dapat digunakan untuk analisis cepat multi-parameter berbagai karakteristik fisik sel tunggal dalam suatu larutan. Sistem kerja *flow cytometry* bergantung pada karakteristik fluoresen atau hamburan cahaya dari suatu sel, kemudian dikonversi menjadi sinyal elektronik, dan dianalisis menggunakan komputer. Pendekatan tersebut menjadikan *flow cytometry* sebagai suatu alat yang baik untuk analisis secara detail suatu populasi sel yang kompleks dalam waktu singkat. Review artikel ini menjelaskan tentang prinsip dasar termasuk komponen dan cara kerja dari *flow cytometry*, juga menjelaskan tentang analisis data dan aplikasinya dalam bidang imunologi, yaitu *immunophenotyping*, analisis respon spesifik antigen, analisis sitokin intraseluler, analisis proliferasi, dan analisis apoptosis.

Kata kunci: *flow cytometry*, prinsip dasar, analisis data, aplikasi, imunologi

ABSTRACT

Flow cytometry is a sophisticated instrument that can be used for rapid analysis of multi-parameters of various physical characteristics of a single cell in a solution. The work system of flow cytometry depends on the characteristics of fluorescence or scattering of light from a cell, then converted into an electronic signal, and analyzed using a computer. This approach makes flow cytometry a good tool for analyzing in detail a complex of cells population in a short time. The review of this article explains the basic principles including the components and work methods of flow cytometry, also describes data analysis and its applications in the field of immunology, namely immunophenotyping, analysis of antigen specific responses, analysis of intracellular cytokines, proliferation analysis, and apoptotic analysis.

Keywords: *flow cytometry, basic principles, data analysis, applications, immunology*

Pendahuluan

Flow cytometry merupakan suatu instrumen yang pada awalnya hanya dapat mendeteksi ukuran sel

saja, kemudian berkembang menjadi suatu instrumen yang sangat canggih dengan kemampuan mendeteksi berbagai parameter secara bersamaan

(Wilkerson, 2012). *Flow cytometry* memiliki kemampuan untuk mengukur karakteristik optik dan fluoresensi dari sel tunggal atau partikel lain (mikroorganisme, inti sel, dan kromosom), dalam suatu aliran cairan ketika sel tunggal atau partikel tersebut melewati sumber cahaya (Chattopadhyay, et al., 2008). Parameter yang sering digunakan dalam menganalisis dan membedakan sel menggunakan *flow cytometry* yaitu ukuran, granularitas, dan fitur fluoresens sel, yang berasal dari antibodi atau pewarna (Wilkerson, 2012).

Review artikel ini menjelaskan mengenai prinsip dasar, interpretasi data, dan aplikasi dalam bidang imunologi dari *flow cytometry*, yang dapat menjadi bahan yang bermanfaat bagi para peneliti.

Prinsip Dasar *Flow cytometry*

Prinsip dasar *flow cytometry* yaitu hamburan cahaya dan emisi fluoresensi, yang disebabkan oleh sumber eksitasi (umumnya sinar laser) yang menyerang partikel yang bergerak. Data yang dihasilkan dapat memberikan informasi penting tentang aspek biokimia, biofisik, dan molekuler. Hamburan cahaya secara langsung terkait dengan sifat struktural dan morfologi sel, sedangkan emisi fluoresensi yang berasal dari probe fluoresen sebanding dengan jumlah probe fluoresen yang terikat pada sel atau komponen seluler (Chattopadhyay, et al., 2008).

Sel-sel dalam *flow cytometry* tersuspensi dalam suatu larutan dan disuntikkan ke dalam sistem fluida, dimana larutan tersebut secara hidrodinamik berjalan melalui pusat saluran fluida dengan kecepatan yang seragam. Setelah tiba di zona pengujian, sel-sel secara individual

diuji oleh sinar laser terfokus yang tegak lurus melintasi saluran. Setiap sel menghasilkan informasi intensitas cahaya maju '*Forward Light Scatter*' (FSC) dan cahaya ortogonal (sisi) "*Side Light Scatter*" (SSC). Informasi FSC digunakan untuk mengkarakterisasi ukuran partikel dan indeks bias, sedangkan informasi SSC digunakan untuk analisis struktur internal sel (Chen & Cherian, 2017) (Leith, 2017) (Li, et al., 2017).

Analisis sel tunggal sangat penting dalam melakukan uji biologis populasi sel yang sangat heterogen, seperti darah manusia (Guck & Chilvers, 2013) (Ebrahimifard, et al., 2017). *Flow cytometry* berguna dalam analisis tidak hanya sel secara umum, tetapi juga komponen seluler, seperti organel, inti sel, DNA, RNA, kromosom, sitokin, hormon, dan protein (Guck & Chilvers, 2013). *Flow cytometry* merupakan teknik yang efisien untuk mendeteksi sifat antigen dari membran, sitoplasma, dan nukleus pada sampel biologis (Ebrahimifard, et al., 2017). Analisis proliferasi sel dan siklus sel, pengukuran fluks kalsium dan potensial membran, merupakan contoh umum dari metode yang dikembangkan dari *flow cytometry* (Wlodkowic, et al., 2011) (Wlodkowic, et al., 2013). Oleh karena itu, *flow cytometry* memainkan peran penting dalam banyak aplikasi biologis dan medis.

Berdasarkan fungsi dari *flow cytometry* yang dapat menyediakan analisis multiparametrik dengan berbagai informasi yang dihasilkan, menjadikan *flow cytometry* sebagai suatu alat penting dalam penemuan obat baru. Namun, penelitian menggunakan *flow cytometry* memiliki beberapa tantangan yaitu

ketika analisis platelet yang dicuci (buffer fisiologis) atau plasma yang kaya platelet, dan uji fungsi platelet lainnya, rentan terhadap aktivasi platelet *in vitro*. Berbagai agen antiplatelet (misalnya, penangkap *apyrase* (*Adenosine Diphosphate*) (ADP)), indometasin (penghambat siklooksigenase) atau prostaglandin E1 (PGE1, yang secara tidak langsung merangsang adenil siklase dan mengurangi pensinyalan Ca^{2+}) dapat digunakan untuk menghindari preaktivasi platelet selama prosedur pemisahan. Namun, penggunaan senyawa tersebut tidak selalu diinginkan, karena membuat kondisi pengujian yang kurang fisiologis (Thomas, et al., 2019). Tantangan lainnya yaitu *flow cytometry* terbatas hanya untuk sampel cair, sehingga sebelum melakukan analisis, sel harus dibuat secara menyeluruh dalam cairan (Sonowal, et al., 2018). Kecepatan deteksi dari *flow cytometry* juga berubah menjadi lebih lambat ketika perkembangan ukuran instrumen menjadi lebih kecil (Gong, et al., 2018).

Selama dekade terakhir, berbagai aplikasi skrining *flow cytometry* telah banyak dilaporkan, yaitu uji pengikatan ligan untuk skrining ligan *G-Protein-Coupled Receptor* (GPCR) baru (Young, et al., 2005), skrining dan pensinyalan profil menggunakan sel-sel berkode (Krutzik & Nolan, 2006), skrining fenotip dari limfosit T sitotoksik eksositosis granul litik dalam format 1536-well (Zhao, et al., 2015), dan skrining berbasis ragi (Chen, et al., 2012). Selain aplikasi berbasis sel, *flow cytometry* juga banyak digunakan dalam immunoassay berbasis manik untuk skrining sitokin yang disekresikan dan protein lain dalam format *multiplexed* (Roman, et

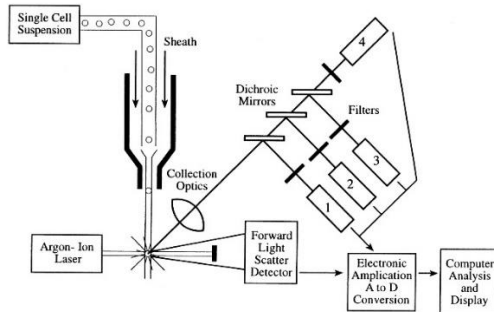
al., 2007) (Curpan, et al., 2011) (Surviladze, et al., 2012).

Dibandingkan dengan teknologi pengujian lainnya dengan pembacaan sederhana, skrining berbasis pencitraan dan *flow cytometry* memungkinkan pengukuran multiparametrik dalam lingkungan fisiologis sel yang lebih kompleks, sehingga sering disebut '*high content screening*' (Bickle, 2010). *Flow cytometry* memiliki beberapa keunggulan dibandingkan skrining berbasis pencitraan. Pertama, secara fisik dapat memisahkan sel dan menganalisis satu sel pada satu waktu dari populasi sel heterogen tanpa perlu mengembangkan algoritma segmentasi kompleks untuk analisis data, seperti yang diperlukan pada skrining berbasis pencitraan. Kedua, teknologi ini tidak hanya optimal untuk skrining sel suspensi, tetapi juga dapat digunakan untuk skrining sel adheren setelah melepaskan sel dari plate atau flask kultur sel, sementara skrining berbasis pencitraan lebih cocok hanya untuk skrining sel adheren (Haynes, et al., 2009) (Young, et al., 2009). Oleh karena itu, *flow cytometry* melengkapi skrining berbasis pencitraan dan dengan cepat menjadi platform skrining obat yang banyak diminati.

Komponen *Flow Cytometry*

Flow cytometry memiliki tiga komponen utama. Pertama, sistem fluida yang membawa dan meneruskan sel. Kedua, sistem optik, biasanya sinar laser dimana sinar sejalan dengan sistem fluida. Ketiga, detektor dan sistem konversi analog ke digital, yang mengubah pengukuran analog dari cahaya FSC dan SSC, dari sinar laser menjadi sinyal digital yang dapat diproses

oleh sistem komputasi. Gambaran umum instrumen *flow cytometry* dapat dilihat pada Gambar 1, sebagai berikut:



Gambar 1. Gambaran umum instrumen *flow cytometry*

Suspensi sel tunggal melaju hingga terfokus secara hidrodinamik dengan cairan selubung dan terkena sinar laser argon-ion. Sinyal dikumpulkan oleh detektor hamburan cahaya FSC, detektor hamburan cahaya SSC (1), dan beberapa detektor emisi fluoresensi (2-4). Sinyal diperkuat dan diubah ke bentuk digital untuk dianalisis dan ditampilkan di layar computer (Brown & Wittwer, 2000).

Sistem Fluida

Sistem fluida membawa sel dari suatu larutan untuk melewati instrumen. Sistem fluida terdiri dua komponen yaitu cairan selubung dan saluran bertekanan. Cairan selubung adalah pengencer (biasanya *Phosphate-Buffered Saline (PBS)*) yang disuntikkan ke dalam ruang aliran yang terletak di jantung instrumen, dengan bantuan saluran bertekanan yang diteruskan ke dalam tabung sampel dalam ruang aliran. Aliran sampel kemudian mengalir menuju inti pusat dalam aliran cairan selubung yang disebut sebagai “aliran koaksial”, yang didasarkan pada perbedaan tekanan antara cairan

selubung dan aliran sampel (Wilkerson, 2012).

Tekanan sampel selalu lebih besar daripada tekanan cairan selubung, membuat sel-sel terpisah menjadi sel-sel tunggal yang bergerak melalui sinar laser. Hal tersebut memungkinkan penyinaran sel yang seragam yang disebut fokus hidrodinamik. Laju injeksi sel ke dalam sinar laser dapat diatur sesuai dengan tujuan analisisnya. Laju aliran cepat umumnya digunakan untuk pengukuran kualitatif seperti *immunophenotyping* sel, sedangkan laju aliran lambat digunakan untuk aplikasi yang membutuhkan resolusi yang lebih tinggi seperti analisis konten DNA. Laju aliran lambat dapat membuat laju aliran sampel juga menjadi lebih lambat, sehingga dapat meningkatkan keseragaman dan akurasi pencahayaan (Wilkerson, 2012).

Parameter penting untuk menghasilkan penyinaran yang tepat antara partikel dan sinar laser yaitu berdasarkan komponen fluida yang tepat, tidak terkontaminasi. Oleh karena itu, operator harus memastikan bahwa sistem fluida bebas dari gelembung udara dan debris, juga mengatur tekanan yang tepat pada saat pengujian.

Sistem Optik

Flow cytometry memiliki sistem optik yang berfungsi untuk melakukan eksitasi, terdiri dari laser dan lensa serta optik koleksi pada posisi tetap. Lensa digunakan untuk membentuk dan memfokuskan sinar laser. Laser menghasilkan cahaya dengan memberi energi elektron ke orbital energi tinggi dengan tegangan listrik yang tinggi. Foton cahaya dihasilkan ketika elektron berenergi tersebut jatuh kembali ke orbital energi yang lebih rendah (Wilkerson,

2012). Cahaya dibelokkan di sekitar tepi sel setelah laser mengenai sel, yang disebut sebagai hamburan cahaya (FSC dan SSC). Faktor-faktor yang mempengaruhi hamburan cahaya total yaitu membran, nukleus, granularitas sel, bentuk sel, dan topografi permukaan. Ukuran sel atau partikel dan kompleksitas internalnya secara umum menentukan jenis hamburan. Cahaya FSC adalah hasil difraksi yang dikumpulkan sepanjang sumbu yang sama dengan sinar laser. FSC sebanding dengan luas permukaan sel atau ukuran sel, dan menjadi metode yang paling umum digunakan untuk *immunophenotyping*. Cahaya SSC merupakan pengukuran cahaya yang sebagian besar dibiaskan dan dipantulkan, dikumpulkan pada sekitar 90 derajat dari sinar laser. SSC sebanding dengan granularitas sel atau kompleksitas internal. SSC sama pentingnya dengan cahaya fluoresen yang berasal dari antibodi atau pewarna berlabel fluoresen seperti *Propidium Iodide* (PI), yang dipantulkan pada sudut yang sama dengan SSC. Membedakan tipe sel dalam populasi yang heterogen dapat digunakan pengukuran berkorelasi FCS dan SSC (Reggeti & Bienzle, 2011).

Pengaturan laser dalam *flow cytometry* didasarkan pada jenis fluorokrom yang tereksitasi. Laser argon (laser biasa dengan panjang gelombang eksitasi 488 nm) digunakan untuk merangsang banyak pewarna sintesis seperti *Fluorescein Isothiocyanate* (FITC) dan pewarna fluorokrom alami, termasuk alga dan fitoplankton. *Flow cytometry* juga memiliki laser tambahan yaitu ultraviolet yang mengeksitasi sinar ultraviolet (300-400 nm) dan fluorokrom sensitif atau dioda merah

yang mengeksitasi fluorokrom dari rentang jauh merah (630 nm) (Wilkerson, 2012).

Flow cytometry juga memiliki sistem optik koleksi yang terdiri dari kumpulan lensa untuk mengumpulkan cahaya yang dipancarkan dari interaksi antara sinar laser dengan partikel. Optik koleksi juga terdiri dari sistem cermin optik dan filter optik untuk memisahkan dan mengarahkan panjang gelombang spesifik cahaya yang terkumpul ke detektor optik yang sesuai (Reggeti & Bienzle, 2011).

Spesifisitas detektor untuk pewarna fluoresen tertentu ditentukan dengan menempatkan filter yang sesuai yang dapat berupa filter *long pass*, *short pass*, dan *band pass*. Filter *band pass* hanya memungkinkan rentang panjang gelombang yang sempit. Filter *short pass* mentransmisikan panjang gelombang cahaya yang sama dengan atau lebih pendek dari panjang gelombang yang ditentukan, sedangkan filter *long pass* mengirimkan panjang gelombang cahaya yang sama dengan atau lebih panjang dari panjang gelombang yang ditentukan (Reggeti & Bienzle, 2011).

Deteksi Sinyal

Sinyal cahaya yang dihasilkan dari partikel yang melewati sinar laser dalam aliran fluida dikonversi menjadi voltase oleh fotodetektor. Terdapat dua jenis detektor, *Photodiodes* (PD) dan *Photomultiplier Tubes* (PMT), yang dapat dipilih berdasarkan sensitivitasnya (Reggeti & Bienzle, 2011) (Snow, 2004). *Photocathode* dari PMT memiliki sensitivitas yang lebih besar dibandingkan dengan PD, tetapi PD dapat mengubah cahaya

menjadi *photoelectron* dengan cara yang lebih efisien. Oleh karena itu, PD dapat mendeteksi sinyal cahaya kuat yang dihasilkan oleh FSC, sedangkan PMT umumnya digunakan untuk mendeteksi sinyal lemah yang dihasilkan oleh SSC dan fluoresen (Reggeti & Bienzle, 2011).

Sinyal cahaya yang ditangkap oleh PMT atau PD diubah menjadi sejumlah elektron untuk menghasilkan arus listrik. Arus listrik mengalir ke amplifier dan diubah menjadi tegangan. Jumlah maksimum sebaran atau fluoresensi diperoleh saat partikel berada di tengah sinar, dan saat partikel meninggalkan sinar, tegangan kembali ke garis dasar (Snow, 2004).

Sinyal analog yang diukur sebagai kuantitas analog dihasilkan setelah perubahan sinyal cahaya awal menjadi arus listrik oleh detektor. Arus listrik tersebut kemudian diperkuat oleh dua jenis amplifier, yaitu linear dan logaritmik. Sinyal analog yang diperoleh harus dirubah menjadi sinyal digital oleh konverter analog ke digital untuk pemrosesan pada komputer. Sinyal kemudian menjadi data digital yang dapat ditampilkan menjadi plot atau histogram (Snow, 2004).

Flow Cell Sorters

Flow Cell Sorters berfungsi untuk menangkap dan memisahkan sel. Setelah sel-sel yang diinginkan terkumpul, sel tersebut kemudian dapat digunakan untuk analisis lebih lanjut seperti uji mikroskopis, biokimia, dan fungsional. Parameter tunggal atau kombinasi beberapa parameter, dapat digunakan untuk memisahkan sel. Prinsip umum *flow cell sorters* didasarkan pada defleksi elektrostatik dari tetesan bermuatan, beberapa diantaranya mengandung sel. Sel-sel disuntikkan melalui pipa

untuk membentuk aliran tetesan teratur dengan menerapkan getaran ke pipa. Tetesan tersebut kemudian melewati satu atau lebih sinar laser dan diberikan elektroda pada saat yang sama. Tetesan dapat dibelokkan dari arus utama berdasarkan muatan yang diberikan. Tetesan bermuatan positif dibelokkan ke arah platinum dengan muatan negatif, tetesan bermuatan negatif dibelokkan ke arah platinum bermuatan positif dan tetesan yang tidak bermuatan terkumpul ke dalam wadah limbah (Wilkerson, 2012).

Interpretasi Data

Prinsip utama dari analisis data menggunakan *flow cytometry* adalah secara selektif menunjukkan sel-sel yang diinginkan dan mengetahui lebih banyak tentang sel-sel yang diuji. Metode ini disebut “*gating*” dalam *flow cytometry*, yang dapat didefinisikan sebagai satu atau lebih daerah yang digabungkan. Suatu daerah dapat didefinisikan sebagai satu set titik yang dipilih dengan teliti oleh pengguna. Pemilihan tersebut menentukan daerah yang akan ditampilkan pada grafik. Beberapa daerah dapat ditampilkan pada grafik yang sama. Metode tersebut digunakan untuk menghilangkan hasil dari partikel yang tidak diinginkan seperti sel mati dan debris. Aplikasi paling umum dari strategi *gating* adalah dengan menggunakan plot FSC dan SSC. Sel darah putih, granulosit, monosit dan limfosit memiliki karakteristik fisik yang berbeda satu sama lain (Fleisher & Oliveira, 2019).

Data yang diperoleh dapat didefinisikan dengan metode *gating*. *Gate* merupakan batas numerik atau grafis yang dapat digunakan untuk menentukan karakteristik partikel untuk analisis lebih lanjut. Misalnya,

dalam sampel darah yang mengandung populasi campuran sel, memungkinkan untuk membatasi analisis hanya pada limfosit. Berdasarkan FSC atau ukuran sel, gate dapat ditampilkan pada plot FSC *vs* SSC untuk analisis limfosit. Tampilan yang dihasilkan akan mencerminkan sifat fluoresensi hanya limfosit. Data dapat ditampilkan oleh beberapa tipe plot yang berbeda. Dimulai dari histogram ke plot 2-D, seperti plot dot, plot kontur, dan kepadatan, hingga plot 3-D seperti plot tomogram (Fleisher & Oliveira, 2019).

Histogram merupakan plot parameter tunggal di mana sumbu x mewakili nilai fluoresensi relatif atau intensitas hamburan cahaya dan sumbu y mewakili jumlah peristiwa (jumlah sel). *Flow cytometry* seharusnya menghasilkan puncak tunggal, tetapi terkadang pada populasi campuran sel yang dianalisis menggunakan *flow cytometry* juga dapat menghasilkan beberapa puncak histogram. Data tersebut berguna untuk mengevaluasi jumlah total sel dalam sampel yang memiliki sifat fisik yang dipilih atau mengekspresikan penanda yang dipilih (Fleisher & Oliveira, 2019).

Data plot dua parameter juga dihasilkan dari analisis menggunakan *flow cytometry*. Data plot tersebut merupakan grafik yang menampilkan dua parameter pengukuran, satu pada sumbu x dan satu pada sumbu y. Jumlah sel ditampilkan sebagai plot kepadatan (titik) atau peta kontur. Parameter dapat berupa fluoresensi, FCS, atau SSC. Marker kuadran membagi plot dua-parameter menjadi empat bagian untuk membedakan populasi sebagai negatif, positif tunggal, atau positif ganda. Kuadran kanan atas plot menunjukkan sel-sel

positif untuk penanda fluoresen atau positif ganda. Kuadran kiri bawah menunjukkan negatif untuk kedua penanda. Kuadran kiri atas menunjukkan hanya positif untuk parameter sumbu y. Kuadran kanan bawah menunjukkan hanya positif untuk parameter sumbu x (Fleisher & Oliveira, 2019).

Aplikasi

Banyak teknik dan aplikasi dalam berbagai bidang penelitian yang dapat digunakan dengan menggunakan *flow cytometry*. Bagian ini menjelaskan aplikasi dari *flow cytometry* khususnya dalam bidang imunologi.

Immunophenotyping

Flow cytometry secara umum sering digunakan dalam *immunophenotyping*, dengan memanfaatkan kemampuan unik dari *flow cytometry* yang secara bersamaan dapat menganalisis populasi campuran dari sel imun dengan berbagai parameter. Pengujian *immunophenotyping* dilakukan dengan mewarnai sel yang ditargetkan dengan antibodi terkonjugasi-fluorokrom terhadap antigen pada permukaan sel. Sebagian besar antigen tersebut diberi nomor “*Cluster of Differentiation*” atau nomor CD oleh *Human Leukocyte Differentiation Workshops*, sehingga digunakan nomenklatur umum untuk menentukan antibodi monoklonal yang diarahkan terhadap antigen seluler spesifik. Contohnya, CD3 digunakan untuk menentukan ko-reseptor sel T yang ada pada semua sel T (McKinnon, 2018).

Setiap sel imun memiliki penanda CD spesifik dari suatu populasi sel. Penanda sel tersebut disebut “*lineage markers*”, yang

digunakan untuk menentukan suatu sel dalam populasi sel tertentu, untuk analisis tambahan dalam setiap pengujian *immunophenotyping*. Contohnya adalah penanda sel T (CD3, CD4, CD8), penanda sel B (CD19, CD20), penanda monosit (CD14, CD11b), dan penanda sel *Natural Killer* (NK) (CD56, CD161) (McKinnon, 2018).

Selain penanda yang digunakan untuk menentukan populasi sel imun, penanda lain juga digunakan untuk mengkarakterisasi setiap populasi sel. Penanda tersebut diantaranya yaitu, penanda aktivasi (CD69, CD25, CD62L), penanda memori (CD45RO, CD27), penanda *homing* jaringan ($\alpha 4/\beta 7$), dan penanda reseptor kemokin (CCR7, CCR5, CXCR4, CCR6). *Immunophenotyping* juga sering digunakan dalam penandaan intraseluler seperti FoxP3 (sel Treg), sitokin (IFN- γ , TNF- α , IL-2, sel TH1), penanda proliferasi (Ki67, *Carboxyfluorescein Succinimidly Ester* (CFSE)), dan penanda spesifik antigen (*Major Histocompatibility* atau MHC). Instrumen dan reagen yang ada saat ini mampu melakukan 28 percobaan warna *immunophenotyping*, tetapi secara umum yang banyak dilakukan yaitu pengujian dalam kisaran 12-15 warna (McKinnon, 2018).

Penghitungan sel absolut juga dapat dilakukan pada setiap pengujian *immunophenotyping*. Prosedurnya menggunakan fluoresen 'beads' dari konsentrasi yang diketahui yang diperoleh bersama dengan sampel. Sampel dianalisis dan jumlah 'gated' sel untuk populasi yang diinginkan dibandingkan dengan jumlah 'beads' yang diperoleh dalam sampel yang sama untuk menghasilkan jumlah sel per mililiter (McKinnon, 2018).

Respon Spesifik Antigen

Respons spesifik antigen dapat diukur dengan menstimulasi sel-sel imun dengan antigen spesifik, kemudian dilihat dari produksi sitokin, proliferasi, aktivasi, memori, atau pengenalan antigen melalui multimer MHC. Multimer MHC adalah monomer MHC (MHC-I atau MHC-II) yang biasanya terbiotinilasi dan kemudian diikat ke fluoresen tulang belakang streptavidin dalam kelompok 4 (tetramer), 5 (pentamer), atau 10 (dextramer). Multimer MHC ini "dimuat" dengan antigen pilihan dan kemudian digunakan untuk mengikat sel T yang mengenali antigen, sehingga menunjukkan tingkat respons terhadap antigen spesifik. Aplikasi ini biasa digunakan dalam studi vaksin (McKinnon, 2018).

Analisis Sitokin Intraseluler

Analisis sitokin intraseluler dilakukan dengan menguji sel imun dengan penghambat transpor protein (Brefeldin A atau Monensin) selama 2 hingga 12 jam untuk menghasilkan sitokin yang diproduksi oleh sel terakumulasi di dalam sel, sehingga dapat dilakukan deteksi yang lebih baik. Sel dapat dirangsang dengan berbagai antigen selama proses inkubasi tersebut, seperti peptida dari vaksin, untuk mengukur respon imun. Setelah pengujian penghambat transport protein, sel diwarnai untuk penanda viabilitas dan penanda permukaan sel, kemudian difiksasi dan permeabilisasi untuk pewarnaan intraseluler dengan antibodi anti-sitokin (McKinnon, 2018).

Analisis Proliferasi

Proliferasi sel dapat diukur dengan *flow cytometry* menggunakan beberapa pengujian dan penanda yang berbeda. Pengujian ini menggunakan metode yang berbeda untuk menargetkan kejadian yang berhubungan dengan proliferasi seperti penggabungan timidin analog (*Bromodeoxyuridine* (BrdU)) ke dalam replikasi DNA, pelacakan generasi pewarna permanen yang dapat diwariskan (CFSE), dan ekspresi antigen yang berhubungan dengan proliferasi (Ki67, *Proliferating Cell Nuclear Antigen* (PCNA)) (McKinnon, 2018).

Salah satu contoh dari analisis proliferasi yaitu pengujian proliferasi timidin 3H, dilakukan dengan menggunakan analog timidin BrdU atau EdU (*Ethynyl Deoxyuridine*). Sel diinkubasi selama 2 hingga 6 jam, kemudian sel diwarnai untuk penanda permukaan (opsional) dan difiksasi juga dipermabilisasi untuk pewarnaan BrdU atau EdU. Prosedur BrdU yaitu dengan menggunakan DNase sehingga BrdU bisa digunakan untuk pewarnaan antibodi, tetapi pada prosedur EdU yaitu dengan menggunakan tembaga yang dikatalisis untuk mendeteksi EdU. Kedua metode tersebut biasanya diimbangi dengan pewarna pengikat DNA seperti propidium iodida. Pewarnaan untuk penanda antigen intraseluler tambahan juga dapat digunakan selain menggunakan metode BrdU dan EdU (McKinnon, 2018).

CFSE dan pewarna serupa lainnya (*CellTrace Violet* dan *FarRed*) melintasi membran seluler dalam sel hidup dan mengikat secara kovalen dan permanen ke struktur intraseluler (biasanya ke residu lisin atau amina lainnya). Sel-sel anak dari setiap generasi berikutnya

menurunkan pewarna yang dapat digunakan untuk analisis proliferasi jangka panjang. Teknik tersebut sangat berguna ketika melakukan pengujian proliferasi yang dihasilkan dari stimulasi antigen jangka panjang. Ekspresi antigen yang berhubungan dengan proliferasi juga dapat digunakan sebagai penanda untuk proliferasi. Ki67 adalah protein yang diekspresikan selama semua fase proliferasi sel. PCNA diperlukan untuk replikasi DNA. Kehadiran Ki67 atau PCNA merupakan indikator proliferasi sel (McKinnon, 2018).

Analisis Apoptosis

Deteksi apoptosis oleh *flow cytometry* menggunakan banyak target di sepanjang kaskade kejadian yang berhubungan dengan apoptosis. Beberapa metode yang dapat digunakan antara lain berdasarkan perpindahan fosfatidilserin ke lapisan luar membran plasma dideteksi dengan pewarnaan Annexin V, penyerapan DNA endonuklease dideteksi dengan uji TUNEL (TdT dUTP Nick End Labeling), dan aktivasi caspase dapat dideteksi oleh antibodi dan pewarna. Apoptosis mitokondria ditargetkan oleh pewarna yang menentukan potensial membran mitokondria dan kondensasi kromatin dalam nukleus, yang terdeteksi dengan pewarnaan dengan Hoescht 33342. Annexin V adalah protein pengikat fosfolipid yang berikatan dengan fosfatidilserin ketika pindah ke lapisan luar membran sel selama apoptosis. Pewarnaan selain viabilitas (seperti propidium iodida) harus digunakan ketika pewarnaan dengan Annexin V untuk memastikan bahwa pengikatan terjadi pada permukaan luar membran sel. TUNEL adalah teknik yang memanfaatkan kemampuan

Terminal deoxynucleotidyl Transferase (TdT) untuk melabeli ujung-ujung DNA yang berhubungan dengan apoptosis dengan dUTP (*deoxyuridine triphosphate*) atau BrdU. DUTP atau BrdU diberi label dengan fluorokrom untuk deteksi dan selnya diberi pewarnaan dengan pewarna DNA sebelum analisis data (McKinnon, 2018).

Jalur pensinyalan caspase diaktifkan pada sebagian besar kasus apoptosis, kemudian ditargetkan dengan menggunakan pewarnaan intraseluler dan antibodi yang spesifik untuk bentuk aktif caspase 3. Terdapat juga pengujian tambahan yang menggunakan substrat fluorogenik yang ketika terpapar aktivitas caspase akan terbelah dan memancarkan fluoresensi. Apoptosis mitokondria tidak selalu memanfaatkan jalur caspase sehingga metode yang berbeda dapat digunakan untuk deteksi. Sebagian besar metode tersebut memeriksa potensi membran mitokondria seperti menggunakan pewarna JC-1. Namun, terdapat juga antibodi terhadap APO2.7 yang berpindah pada membran mitokondria dan hanya diekspresikan selama apoptosis, yang dapat dilakukan dalam pengujian (McKinnon, 2018).

Simpulan

Flow cytometry dalam bidang imunologi dapat digunakan untuk immunophenotyping, analisis respon spesifik antigen, sitokin intraseluler, proliferasi, dan apoptosis. Kelebihan dari *Flow cytometry* yaitu dapat digunakan sebagai alat yang paling baik untuk analisis berbagai jenis sampel dalam waktu singkat, yang memberikan informasi penting tentang pertanyaan menarik yang terjadi pada berbagai bidang penelitian kesehatan saat ini,

terutama yang berhubungan dengan sel. Perkembangan *flow cytometry* memperluas kegunaannya dalam karakterisasi berbagai aspek fungsi sistem imun. Kekurangan dari *flow cytometry* yaitu analisis hanya dapat dilakukan pada larutan suspensi sel, tidak dapat dilakukan untuk sel-sel pada jaringan padat, juga harga dan perawatan dari instrumen tersebut sangat mahal, dan membutuhkan operator yang terlatih untuk mengoperasikan dan menganalisis data dari *flow cytometry*.

Daftar Pustaka

- Bickle, M., 2010. The beautiful cell: high-content screening in drug discovery. *Anal. Bioanal. Chem.*, Volume 398, pp. 219-226.
- Brown, M. & Wittwer, C., 2000. Flow cytometry: principles and clinical applications in hematology. *Clinical Chemistry*, 46(8), pp. 1221-1229.
- Chattopadhyay, P. K., Hogerkorp, C. M. & Roederer, M., 2008. A chromatic explosion: the development and future of multiparameter flow cytometry. *Immunology*, Volume 125, pp. 441-449.
- Chen, J. et al., 2012. Identification of a small molecule yeast torc1 inhibitor with a flow cytometry-based multiplex screen. *ACS Chem. Biol.*, Volume 7, pp. 715-717.
- Chen, X. & Cherian, S., 2017. Acute myeloid leukemia immunophenotyping by flow cytometric analysis. *Clin. Lab. Med.*, Volume 37, pp. 753-769.
- Curpan, R. F. et al., 2011. High-throughput screen for the chemical inhibitors of antiapoptotic bcl-2 family proteins by multiplex flow

- cytometry. *Assay Drug Dev. Technol.*, Volume 9, pp. 465-474.
- Ebrahimifard, R. et al., 2017. An infrared sensor system for the analysis and differentiation of living mammalian cells using D2O based microfluidics. *Sens. Actuators B: Chem.*, Volume 247, pp. 981-991.
- Fleisher, T. A. & Oliveira, J. B., 2019. 92 - Flow cytometry. In: *Clinical Immunology (Fifth Edition): Principles and Practice*. s.l.:Elsevier, pp. 1239-1251.
- Gong, Y. et al., 2018. New advances in microfluidic flow cytometry. *Electrophoresis*, 40(8), pp. 1212-1229.
- Guck, J. & Chilvers, E. R., 2013. Mechanics meets medicine. *Sci. Transl. Med.*, Volume 5, pp. 1-3.
- Haynes, M. K. et al., 2009. Detection of intracellular granularity induction in prostate cancer cell lines by small molecules using the hypercyt high-throughput flow cytometry system. *J. Biomol. Screen.*, Volume 14, pp. 596-609.
- Krutzik, P. O. & Nolan, G. P., 2006. Fluorescent cell barcoding in flow cytometry allows high-throughput drug screening and signaling profiling. *Nat. Methods*, Volume 3, pp. 361-368.
- Leith, C. P., 2017. Cost-effective flow cytometry testing strategie. *Clin. Lab. Med.*, Volume 37, pp. 915-929.
- Li, J., Wertheim, G., Paessler, M. & Pillai, V., 2017. Flow cytometry in pediatric hematopoietic malignancies. *Clin. Lab. Med.*, Volume 37, pp. 879-893.
- McKinnon, K. M., 2018. Flow cytometry: an overview. *Current Protocols in Immunology*, Volume 120, pp. 5.1.1-5.1.11.
- Reggeti, F. & Bienzle, D., 2011. Flow cytometry in veterinary oncology. *Vet. Pathol.*, Volume 48, pp. 223-235.
- Roman, D. L. et al., 2007. Identification of small-molecule inhibitors of rgs4 using a high-throughput flow cytometry protein interaction assay. *Mol. Pharmacol.*, Volume 71, pp. 169-175.
- Snow, C., 2004. Flow cytometer electronics. *Cytometry A*, Volume 57, pp. 63-69.
- Sonowal, S., Chikkaputtaiah, C. & Velmurugan, N., 2018. Role of flow cytometry for the improvement of bioprocessing of oleaginous microorganisms. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 94(6), pp. 1712-1726.
- Surviladze, Z., Young, S. M. & Sklar, L. A., 2012. High throughput flow cytometry bead-based multiplex assay for identification of rho gtpase inhibitors. *Methods Mol. Biol.*, Volume 827, pp. 253-270.
- Thomas, A. B., Andrew, L. F. & Alan, D. M., 2019. 35 - Flow Cytometry. In: *Platelets (Fourth Edition)*. s.l.:Academic Press, pp. 627-651.
- Wilkerson, M. J., 2012. Principles and applications of flow cytometry and cell sorting in companion animal medicine. *Vet. Clin. North. Am. Small Anim. Pract.*, Volume 42, pp. 53-71.
- Wlodkowic, D. et al., 2013. Multiparameter analysis of apoptosis using lab-on-a-chip flow cytometry. *Curr. Protoc. Cytom.*, Volume 66, pp. 9.42.1-9.42.15.

Wlodkowic, D., Skommer, J. & Darzynkiewicz, Z., 2011. Rapid quantification of cell viability and apoptosis in b-cell lymphoma cultures using cyanine syto probes. *Methods Mol. Biol.*, Volume 740, pp. 81-89.

Young, S. M. et al., 2009. Duplex high-throughput flow cytometry screen identifies two novel formylpeptide receptor family probes. *Cytometry A*, Volume 75, p. 253–263.

Young, S. M. et al., 2005. High-throughput screening with hypercyt flow cytometry to detect small molecule formylpeptide receptor ligands. *J. Biomol. Screen.*, Volume 10, pp. 374-382.

Zhao, Z. et al., 2015. A high-throughput phenotypic screen of cytotoxic t lymphocyte lytic granule exocytosis reveals candidate immunosuppressants. *J. Biomol. Screen.*, Volume 20, p. 359–371.