

ANALISA PENCIRIAN MORFOLOGI UNIT
PEMBENTUK KOLONI PROGENITOR
MIELOID MENCIT MENGGUNAKAN
KAEDAH PEMPROSESAN
IMEJ DIGITAL

HO WENG TIM

UNIVERSITI KEBANGSAAN MALAYSIA

ANALISA PENCIRIAN MORFOLOGI UNIT PEMBENTUK KOLONI
PROGENITOR MIELOID MENCIT MENGGUNAKAN
KAEDAH PEMPROSESAN IMEJ DIGITAL

HO WENG TIM

TESIS YANG DIKEMUKAKAN UNTUK MEMENUHI SEBAHAGIAN
DARIPADA SYARAT MEMPEROLEH IJAZAH SARJANA MUDA
SAINS BIOOPERUBATAN DENGAN KEPUJIAN

FAKULTI SAINS KESIHATAN
UNIVERSITI KEBANGSAAN MALAYSIA
KUALA LUMPUR

2021



PROGRAM SAINS BIOPERUBATAN

PERAKUAN SEMAKAN TESIS AKHIR

Kami sebagai pemeriksa dan penyelia, telah menyemak dan berpuas hati dengan semua pembetulan, tambahan atau penulisan semula yang dibuat oleh calon berdasarkan cadangan dipersetujui semasa pemeriksaan. Kami dengan ini mengesahkan, Salinan tesis ini sedia untuk dijilid keras.

Terima kasih.

Pemeriksa


Nama Pemeriksa


DR. IZATUS SHIMA TAIB
Pensyarah Universiti DS51
Program Sains Bioperubatan
Tandatangan: **Fakulti Sains Kesihatan**
Universiti Kebangsaan Malaysia

Tarikh 2 Ogos 2021

Penyelia

Nama Pemeriksa


PROF. MADYA DR. ZARIYANTEY ABDUL HAMID
Pensyarah
Program Sains Bioperubatan
Tandatangan: **Pusat Pengajian Sains Diagnostik dan Kesihatan Gunaan**
Fakulti Sains Kesihatan
Universiti Kebangsaan Malaysia

Tarikh 2 Ogos 2021

PENGAKUAN

Saya akui karya ini adalah hasil kerja saya sendiri kecuali nukilan dan ringkasan yang tiap-tiap satunya telah saya jelaskan sumbernya.

31 Julai 2021

HO WENG TIM
A164567

PENGHARGAAN

Pertama sekali saya ingin mengucapkan jutaan terima kasih kepada penyelia saya Prof Madya Dr. Zariyantey Abdul Hamid atas tunjuk ajar, dorongan dan nasihatnya diberi sepanjang saya melakukan penyelidikan ini. Beliau juga memberikan ilmu pengetahuan tentang projek ini yang tidak ternilai kepada saya. Selain itu, tidak lupa kepada penyelia bersama Dr Wan Mimi Diyana Wan Zaki dan Dr. Aqilah Baseri Huddin di atas bantuan dan tunjuk ajar yang begitu banyak sehingga berjaya menyiapkan kajian ini.

Saya ingin merakamkan ribuan terima kasih kepada Program Sains Bioperubatan, Fakulti Sains Kesihatan, Universiti Kebangsaan Malaysia kerana memberi peluang kepada saya untuk menimba ilmu dan menyiapkan kajian ini. Di samping itu, saya juga ingin mengucapkan terima kasih kepada pelajar siswazah, R.Ramanaesh Rao atas kesudian memberikan tunjuk ajar dalam kelangsungan projek tahun akhir saya. Pengalaman beliau memainkan peranan penting dalam kelancaran penyelidikan saya. Bukan itu sahaja, beliau juga memberikan cadangan kepada saya sepanjang saya melakukan penyelidikan saya.

Saya juga ingin mengucapkan terima kasih kepada keluarga saya atas segala sokongan dan motivasi yang diberikan. Ucapan terima kasih juga tidak terhitung untuk kawan-kawan saya di atas segala bantuan yang telah diberikan. Saya hargai setiap saat dan kenangan yang telah tercipta. Begitu juga dengan semua pihak yang membantu secara langsung mahupun tidak langsung dalam saya menjalankan dan menyiapkan kajian ini. Jasa baik kalian akan saya kenang sehingga ke akhir hayat.

Akhir kata, saya hargai setiap ilmu yang dicurahkan kepada saya dan terima kasih sekali lagi buat insan yang pernah memberi ilmu kepada diri ini. Doakan semoga banyaknya ilmu menjadikan insan ini lebih merendah diri dan menghargai. Buat semua pensyarah, semoga jasa murni kalian dalam memberi ilmu mendapat ganjaran yang tidak terhingga.

Terima kasih atas segalanya.

ABSTRAK

Sel stem dan progenitor hematopoietik (SSPH) memainkan peranan penting untuk pengekalan proses hematopoiesis melalui keupayaan untuk membeza kepada pelbagai jenis sel darah matang. Asai unit pembentuk koloni (UPK) adalah asai in-vitro untuk menguji kebolehpayaan proliferasi dan pembezaan sel SSPH berbeza keturunan. Melalui asai UPK, pembentukan UPK yang spesifik daripada SSPH berbeza keturunan dapat dinilai melalui pengkulturan dalam tempoh 7-14 hari. UPK boleh dikelaskan secara morfologi berdasarkan komitmen keturunan sel yang terdiri daripada keturunan mieloid, eritroid dan limfoid. Dalam kaedah konvensional, penentuan ciri morfologi UPK adalah dijalankan secara manual melalui mikroskop songsang. Namun, kaedah ini membawa limitasi seperti memerlukan masa yang panjang, beban kerja yang tinggi dan memerlukan kakitangan terlatih untuk menjalankan analisa. Untuk mengatasi limitasi ini, kaedah pemprosesan imej digital digunakan untuk membangunkan kaedah automasi pengenalanpastian morfologi UPK dengan lebih tepat dan cekap. Oleh itu, kajian ini bertujuan untuk menyelidik ciri-ciri morfologi yang dapat membezakan jenis UPK dari keturunan mieloid melalui kaedah pemprosesan imej digital. Asai UPK mieloid menggunakan sel sum-sum tulang mencit yang diisolasi segar dan pengkulturan asai UPK dilakukan selama 14 hari. Seterusnya, perolehan imej bagi tiga jenis UPK mieloid iaitu UPK-granulosit (UPK-G), UPK-granulosit makrofaj (UPK-GM) dan UPK-makrofaj (UPK-M) diambil menggunakan telefon pintar Samsung Galaxy J7 2016, mikroskop songsang Olympus Model NKX41 dan penyesuai telefon pintar oleh SOLOMARK. Setiap pembesaran ($\times 4$, $\times 10$, $\times 20$ dan $\times 40$) mengambil 92 imej dengan jumlah akhir iaitu 368 imej. Selepas proses penyaringan, 210 imej akhir dianalisa melalui perisian MATLAB versi 2021 dengan kaedah *regionprops* dan data tersebut seterusnya dianalisa melalui perisian SPSS versi 25. Ciri-ciri morfologi yang dikaji termasuk sentroid (x-koordinat), sentroid (y-koordinat), eksentrik, kepanjangan minor axis, kepanjangan major axis, orientasi, kawasan, keluasan, kekukuhan, diameter setara dan perimeter. Hasil kajian menunjukkan eksentrik merupakan ciri morfologi UPK progenitor mieloid yang dikenalpasti pada kebanyakan pembesaran iaitu $\times 4$, $\times 10$ dan $\times 20$. Ciri eksentrik pada pembesaran $\times 4$ dan ciri kawasan serta diameter setara pada pembesaran $\times 10$ merupakan ciri morfologi optimum yang berpotensi untuk dibangunkan sebagai ciri automasi untuk pengkelasan dan pengenalanpastian jenis UPK progenitor mieloid.

MORPHOLOGY FEATURE ANALYSIS OF COLOY FORMING UNIT FOR MICE MYELOID PROGENITOR BY USING DIGITAL IMAGE PROCESSING METHOD

ABSTRACT

Hematopoietic stem and progenitor cells (HSPCs) play an important role in hematopoiesis process through the ability to differentiate into various types of mature blood cells. Colony-forming unit (CFU) assay is an in-vitro assay to measure the proliferation and differentiation ability of different HSPCs lineage. Through CFU assay, specific CFU formation from different HSPCs lineages can be assessed through culturing within 7-14 days. CFU can be classified morphologically based on the lineage commitment consisting of myeloid, erythroid and lymphoid lineages. In the conventional method, the morphological features analysis of CFU is carried out manually through an inverted microscope. However, this method carries limitations such as time consuming, high workload and requires trained staff to conduct the analysis. To overcome these limitations, digital image processing methods are used to develop an automated system for a better accuracy and efficiency in morphological identification of CFU-derived colony. Therefore, this study aims to investigate the morphological features that can distinguish CFU types from myeloid lineage through digital image processing methods. CFU assay was performed using fresh isolated mouse bone marrow cells and cultured for 14 days. Next, image acquisition for three types of myeloid CFU namely CFU-granulocytes (CFU-G), CFU-granulocytes macrophages (CFU-GM) and CFU-macrophages (CFU-M) were taken by using Samsung Galaxy J7 2016 mobile, inverted microscope Olympus Model NKX41 and smartphone adapter by SOLOMARK. Each magnification ($\times 4$, $\times 10$, $\times 20$ and $\times 40$) took 92 images with a final total of 368 images. After image filtration, 210 final number of images is analysed through MATLAB version 2021 software by regionprops method and the data is then analysed by SPSS software version 25. The morphological features which studied are centroid (x-coordinate), centroid (y-coordinate), eccentricity, minor axis length, major axis length, orientation, area, extent, solidity, equivalent diameter and perimeter. The results showed that eccentricity is the morphological feature in myeloid progenitor CFU that identified under most magnification which included $\times 4$, $\times 10$ and $\times 20$. Eccentricity under $\times 4$ magnification with the area and equivalent diameter under $\times 10$ magnification are optimal morphological features that have the potential to be developed as automation features for the classification and identification of myeloid progenitor CFU types.

KANDUNGAN

	Halaman
PENGAKUAN	ii
PENGHARGAAN	iii
ABSTRAK	iv
ABSTRACT	v
KANDUNGAN	vi
SENARAI JADUAL	ix
SENARAI ILUSTRASI	xi
SENARAI SINGKATAN	xii
SENARAI SIMBOL	xiv
BAB I PENGENALAN	
1.1 Pendahuluan	1
1.2 Justifikasi Kajian	3
1.3 Persoalan Kajian	5
1.4 Hipotesis Kajian	5
1.5 Objektif Kajian	5
1.5.1 Objektif umum	5
1.5.2 Objektif khusus	5
BAB II KAJIAN KEPUSTAKAAN	
2.1 Sel Stem	6
2.2 Sel Stem Hematopoietik dan Sel Stem Progenitor Hematopoietik	7
2.3 Aplikasi Sel Stem Hematopoietik	9
2.4 Kepentingan Penganalisa Ciri Morfologi dalam Bidang Biologi	10
2.5 Penghasilan Unit Pembentuk Koloni Hematopoietik	11
2.5.1 Asai unit pembentuk koloni hematopoietik	11
2.5.2 Unit pembentuk koloni (UPK)	12
2.6 Kaedah Pengkelasan Morfologi Unit Pembentuk Koloni	13
2.6.1 Analisis koloni secara manual	13

	2.6.2 Instrumen automasi analisis unit pembentuk koloni yang sedia ada	14
2.7	Asas Pemprosesan Imej Digital	16
	2.7.1 Imej digital	16
	2.7.2 Segmentasi imej	18
2.8	Pengekstrakan Imej dan Analisa	19
BAB III	KAEDAH KAJIAN	
3.1	Bahan-bahan	24
	3.1.1 Bahan kimia	24
	3.1.2 Alat radas	24
	3.1.3 Mencit ICR	25
3.2	Kaedah	26
	3.2.1 Penyediaan sel sum-sum tulang (SST) daripada mencit ICR	26
	3.2.2 Penyediaan bahan kimia untuk isolasi sum-sum tulang dan asai UPK	28
3.3	Kaedah Ujian	28
	3.3.1 Penyediaan asai unit pembentuk koloni	28
3.4	Analisis Bio-Pengimejan	29
	3.4.1 Pengumpulan data	30
	3.4.2 Pelabelan imej	31
	3.4.3 Penyaringan imej	31
	3.4.4 Pra-pemprosesan imej	32
	3.4.5 Pengekstrakan dan pemilihan ciri	32
3.5	Analisa Statistik	33
BAB IV	HASIL KAJIAN	
4.1	Penetapan yang Optimum bagi Perolehan Imej Unit Pembentuk Koloni	34
4.2	Pengenalpasti Ciri Morfologi Unit Pembentuk Koloni Progenitor Berketurunan Mieloid	37
4.3	Penentuan Ciri Morfologi Optimum yang Membezakan Jenis Unit Pembentuk Koloni Progenitor Berketurunan Mieloid	41
	4.3.1 Ciri morfologi optimum yang membezakan jenis UPK progenitor mieloid pada pembesaran $\times 4$	41
	4.3.2 Ciri morfologi optimum yang membezakan jenis UPK progenitor mieloid pada pembesaran $\times 10$	43
	4.3.3 Ciri morfologi optimum yang membezakan jenis UPK progenitor mieloid pada pembesaran $\times 20$	45

4.3.4	Ciri morfologi optimum yang membezakan jenis UPK progenitor mieloid pada pembesaran $\times 40$	47
4.3.5	Ringkasan ciri-ciri morfologi yang membezakan jenis UPK progenitor mieloid pada pembesaran $\times 4$, $\times 10$, $\times 20$ dan $\times 40$	48
BAB V	PERBINCANGAN	49
BAB VI	KESIMPULAN	
6.1	Kesimpulan Kajian	57
6.2	Cadangan Kajian Lanjutan	57
RUJUKAN		59
Lampiran A	Imej Mentah Unit Pembentuk Koloni Progenitor Mieloid	66
Lampiran B	Kaedah Isolasi Sel Sum-sum Tulang Mencit	67

SENARAI JADUAL

No. Jadual		Halaman
Jadual 2.1	Pengkelasan unit pembentuk koloni progenitor berketurunan mieloid dan deskripsi ciri-ciri morfologi unit pembentuk koloni	13
Jadual 3.1	Bilangan imej UPK progenitor berketurunan mieloid yang diambil	31
Jadual 3.2	Ciri-ciri pengambilan imej unit pembentuk koloni	31
Jadual 4.1	Contoh imej berkualiti rendah yang dikecualikan pada pembesaran yang berbeza ($\times 4$, $\times 10$, $\times 20$, $\times 40$)	35
Jadual 4.2	Imej optimum bagi perolehan imej unit pembentuk koloni	36
Jadual 4.3	Bilangan imej unit pembentuk koloni sebelum dan selepas proses penyaringan dilakukan	37
Jadual 4.4	Keputusan pengenalpastian ciri-ciri morfologi UPK progenitor berketurunan mieloid pada pembesaran $\times 4$	38
Jadual 4.5	Keputusan pengenalpastian ciri-ciri morfologi UPK progenitor berketurunan mieloid pada pembesaran $\times 10$	39
Jadual 4.6	Keputusan pengenalpastian ciri-ciri morfologi UPK progenitor berketurunan mieloid pada pembesaran $\times 20$	39
Jadual 4.7	Keputusan pengenalpastian ciri-ciri morfologi UPK progenitor berketurunan mieloid pada pembesaran $\times 40$	40
Jadual 4.8	Ringkasan keputusan pengenalpastian ciri-ciri morfologi UPK progenitor berketurunan mieloid pada pembesaran $\times 4$, $\times 10$, $\times 20$, dan $\times 40$	41
Jadual 4.9	Keputusan ciri morfologi optimum yang membezakan antara UPK-G dengan UPK-GM pada pembesaran $\times 4$	41
Jadual 4.10	Keputusan ciri morfologi optimum yang membezakan antara UPK-G dengan UPK-M pada pembesaran $\times 4$	42
Jadual 4.11	Keputusan ciri morfologi optimum yang membezakan antara UPK-GM dengan UPK-M pada pembesaran $\times 4$	42
Jadual 4.12	Ringkasan ciri-ciri morfologi optimum bagi pembezaan antara jenis UPK progenitor mieloid pada pembesaran $\times 4$	43
Jadual 4.13	Keputusan ciri morfologi optimum yang membezakan antara UPK-G dengan UPK-GM pada pembesaran $\times 10$	43

Jadual 4.14	Keputusan ciri morfologi optimum yang membezakan antara UPK-G dengan UPK-M pada pembesaran $\times 10$	44
Jadual 4.15	Keputusan ciri morfologi optimum yang membezakan antara UPK-GM dengan UPK-M pada pembesaran $\times 10$	44
Jadual 4.16	Ringkasan ciri-ciri morfologi optimum bagi pembezaan antara jenis UPK progenitor mieloid pada pembesaran $\times 10$	45
Jadual 4.17	Keputusan ciri morfologi optimum yang membezakan antara UPK-G dengan UPK-GM pada pembesaran $\times 20$	45
Jadual 4.18	Keputusan ciri morfologi optimum yang membezakan antara UPK-G dengan UPK-M pada pembesaran $\times 20$	46
Jadual 4.19	Keputusan ciri morfologi optimum yang membezakan antara UPK-GM dengan UPK-M pada pembesaran $\times 20$	47
Jadual 4.20	Ringkasan ciri-ciri morfologi optimum bagi pembezaan antara jenis UPK progenitor mieloid pada pembesaran $\times 20$	47
Jadual 4.21	Ringkasan ciri morfologi optimum yang membezakan jenis UPK progenitor mieloid pada pembesaran $\times 4$, $\times 10$, $\times 20$, dan $\times 40$	48

SENARAI SINGKATAN

BFU-E	<i>Burst forming unit-E</i>
CLP	<i>Common lymphoid progenitor</i>
CMP	<i>Common myeloid progenitor</i>
CO ₂	<i>Carbon dioxide</i>
DMEM	<i>Dulbecco's modified eagle medium</i>
E	Eritroid
Epo	Eritropoietin
FBS	<i>Fetal bovine serum</i>
G	Granulosit
GEMM	Granulosit-erithrosit-monosit-makrofaj
GNB	<i>Gaussian naïve Bayes</i>
GM	Granulosit makrofaj
HCl	<i>Hydrochloric acid</i>
IL-3	Interleukin-3
IL-6	Interleukin-6
ICR	<i>Imprinting control region</i>
iPS	<i>Induced pluripotent stem</i>
JPEG	<i>Joint photographic experts group</i>
kb	<i>Kilobyte</i>
k-NN	<i>k-nearest neighbor</i>
M	Makrofaj
NaOH	<i>Natrium hydroxide</i>
PBS	<i>Phosphate buffer saline</i>
RGB	<i>Red, green and blue</i>
SCF	<i>Stimulating colony factor</i>

Sel NK	<i>Natural killer cell</i>
SPSS	<i>Statistic package for the sosial science</i>
SSH	Sel stem hematopoietik
SSPH	Sel stem progenitor hematopoietik
SST	Sum-sum tulang
TLS	<i>Terrestrial laser scanning</i>
TPO	<i>Thrombopoietin</i>
UPK	Unit pembentuk koloni
UKM	Universiti Kebangsaan Malaysia
UKMAEC	Universiti Kebangsaan Malaysia <i>Animal Ethics Committee</i>
V-CNN	<i>Vector-based convolutional neural network</i>

SENARAI SIMBOL

%	Peratus
>	Lebih daripada
<	Kurang daripada
&	Dan
°C	Darjah selsius
+	Tambah
×	Kali
μm	Mikrometer
μl	Mikroliter
cm	Sentimeter
cm ²	<i>Square centimeters</i>
g	Gram
min	Minit
ml	Mililiter
M	Molar
rpm	<i>Revolutions per minute</i>
p	<i>p-value</i>
pH	<i>Power of hydrogen</i>

BAB I

PENGENALAN

1.1 PENDAHULUAN

Sel stem hematopoietik (SSH) berperan penting dalam membentuk sistem hematopoietik dan terlibat dalam pengawalan sistem hematopoiesis. Selain itu, ia turut memainkan peranan penting dalam pengawalan fungsi sistem imun, dan tindak balas keradangan di dalam tubuh manusia. SSH dapat diasingkan dari darah perifer, sum-sum tulang atau darah tali pusat. Hematopoiesis adalah proses pembentukan dan pengeluaran sel darah yang berlaku secara berterusan bermula dari sel stem dan progenitor hematopoietik (Kumar et al. 2019). SSH berupaya menghasilkan pelbagai jenis sel darah seperti sel darah merah, sel darah putih dan platelet yang memainkan fungsi masing-masing. Contohnya, sel darah merah membolehkan pengangkutan oksigen, sel darah putih menjaga sistem imun sesuatu organisma dan bertindak terhadap serangan mikrob dan patogen manakala platelet berinteraksi dalam mengawal pembekuan darah (Ng & Alexander 2017).

SSH mempunyai ciri-ciri biologi seperti berupaya untuk memperbaharui diri sendiri, berkebolehan untuk membahagi kepada pelbagai jenis sel darah, bermigrasi ke seluruh salur darah dan berupaya menjalankan proses apoptosis iaitu kematian sel yang diprogramkan. Keseimbangan antara SSH dalam memperbaharui diri sendiri, pembezaan kepada sel darah matang dan menjalani proses apoptosis memainkan peranan yang penting dalam penentuan bilangan dan jangka SSH dalam badan. Ketidakeimbangannya akan membawa kesan seperti kanser atau penyakit hematologi yang lain. Contohnya, masalah SSH dalam pembahagian sel darah yang lain boleh mengakibatkan anemia disebabkan kekurangan sel darah merah yang dihasilkan (Alenzi et al. 2009 ; Bryder et al. 2006 ; Kondo et al. 2003). Di samping itu, SSH juga mempunyai banyak kegunaan dalam bidang perubatan bagi tujuan terapeutik. Secara

umumnya, berdasarkan kaedah penyelidikan yang dijalankan oleh para saintis, telah membuktikan nilai dan potensi terapeutik SSH melalui rawatan kanser (Chu et al. 2020), pemindahan SSH (Hatzimichael & Tuthill 2010) dan rawatan regeneratif (Müller et al. 2016).

Pembezaan SSH kepada sel darah matang adalah proses berbilang fasa yang merangkumi beberapa peringkat. Dalam hematopoiesis, SSH bermula dengan pembezaan kepada dua cabang keturunan iaitu progenitor mieloid dan progenitor limfoid. Setiap progenitor berupaya untuk membeza kemudian membentuk sel-sel matang yang spesifik kepada keturunan tersebut (Nakahata & Ogawa 1982). Asai unit pembentuk koloni (UPK) adalah asai kultur jangka pendek yang digunakan untuk menilai kadar proliferasi dan pembezaan sel-sel progenitor hematopoietik dalam persekitaran *in vitro*. Asai UPK ini adalah dikembangkan dengan tujuan mengesan populasi sel progenitor hematopoietik yang berasal dari SSH. Potensi asai ini membolehkan pengenalpastian jenis keturunan sel progenitor hematopoietik yang dihasilkan daripada sumber sum-sum tulang, tali pusat darah atau darah periferi berdasarkan pembentukan koloni yang spesifik mengikut keturunan sel progenitor (Skific & Golemovic 2019).

Secara umumnya, kaedah asai UPK dijalankan dengan teknik kultur terhadap sampel dalam matriks separa pepejal yang ditambah dengan gabungan faktor pertumbuhan ataupun sitokin. Media yang lengkap untuk pertumbuhan dan pembezaan optimum bagi sel progenitor hematopoietik ini boleh diperoleh secara komersial. Metilselulosa merupakan media yang paling banyak dipilih sebagai media asai UPK disebabkan kestabilannya dan media ini mempunyai kelikatan optimum yang menyokong pertumbuhan koloni berasal dari sel tunggal progenitor berbeza keturunan. Percambahan dan pembezaan sel progenitor semasa asai UPK dirangsang oleh kehadiran sitokin dalam media kultur dan setiap jenis UPK boleh dikelaskan secara morfologi berdasarkan jenis keturunan sel (Skific & Golemovic 2019). Asai UPK memberikan nilai dan maklumat yang berguna mengenai sifat biologi SSH. Namun, asai ini juga mempunyai cabaran dan kekurangannya. Antaranya termasuk memerlukan masa yang panjang serta kepakaran teknikal untuk mengenalpasti keturunan UPK berdasarkan morfologi koloni (Guo et al. 2016). Di samping itu, pengenalpastian

morfologi UPK secara manual meningkatkan beban kerja dan risiko ralat dalam analisa (Mahalingaiah et al. 2018). Sebagai contoh, UPK-GEMM dan BFU-E mempunyai ciri morfologi yang hampir sama dan ini memberi cabaran terhadap pengenalpastian jenis koloni secara manual yang meningkatkan risiko ralat dalam interpretasi data oleh kakitangan berbeza (Pamphilon et al. 2013).

Pembangunan sistem automasi kaedah pemprosesan imej digital boleh mengatasi limitasi dalam memudahkan proses pengenalpasti dan analisa UPK sistem hematopoietik yang berbeza jenis dan keturunan. Sistem automasi kaedah pemprosesan imej digital merupakan satu sistem automasi yang menggunakan perisian untuk mengekstrak data dari imej digital. Algoritma mengenali bentuk dan corak tertentu dalam imej dan mengumpulkan maklumat kuantitatif untuk digunakan bagi analisa data lanjutan (Dee Lawlor 2018). Dengan menggunakan piawai perisian pengimejan dan algoritma yang dibangunkan secara khusus, memudahkan penganalisis mengenali jenis koloni berlainan keturunan berdasarkan ciri morfologi koloni yang berbeza. Penggunaan platform ini membolehkan penghasilan keputusan dengan ketepatan yang lebih tinggi dan mengurangkan penimbunan masalah dalam pengenalpastian koloni. Ciri-ciri koloni juga boleh ditambah baik melalui imej medan gelap atau imej medan terang untuk meningkatkan ketepatan dalam penganalisaan morfologi koloni (Doulgeroglou et al. 2020). Oleh itu, ciri-ciri morfologi ke atas tiga jenis UPK progenitor mieloid iaitu UPK-granulosit (UPK-G), UPK-granulosit makrofaj (UPK-GM) dan UPK-makrofaj (UPK-M) diekstrak dari imej yang terbentuk daripada koloni progenitor mieloid mencit melalui kaedah automasi algoritma dalam kajian ini.

1.2 JUSTIFIKASI KAJIAN

Kaedah konvensional membawa limitasi dalam mengenali ciri-ciri morfologi koloni progenitor SSH disebabkan pemerhatian dengan mata manusia tidak dapat membezakan morfologi koloni dengan spesifik dan tepat. Di samping itu, limitasi dan cabaran juga termasuk memerlukan kakitangan yang terlatih, memerlukan masa yang panjang, peningkatan hasil ralat dan beban kerja yang besar. Oleh itu, justifikasi kajian ini adalah untuk memudahkan proses pembezaan jenis UPK hematopoietik dan dapat melakukan pengeksrak morfologi koloni daripada imej secara tepat.

Analisa ciri morfologi semakin memainkan peranan penting dalam bidang perubatan. Penyelidikan ciri morfologi juga semakin berkembang dalam penyelidikan koloni sel stem, contohnya kajian daripada Orozco-Fuentes et al. (2019) yang mengkaji ciri morfologi koloni sel stem embrio untuk menentukan pengaruh pengasingan sel dalam koloni terhadap pluripotensi sel stem. Namun, kajian tentang penyelidikan UPK progenitor berketurunan mieloid iaitu UPK-granulosit (UPK-G), UPK-granulosit makrofaj (UPK-GM) dan UPK-makrofaj (UPK-M) masih kurang dijalankan.

Ciri-ciri morfologi UPK progenitor mieloid yang dikaji dalam kajian ini termasuk kawasan, kepanjangan major axis, kepanjangan minor axis, orientasi, keluasan, kekukuhan, diameter setara, perimeter, sentroid (x-koordinat), sentroid (y-koordinat) dan eksentrik. Ciri-ciri morfologi tersebut adalah berdasarkan kajian oleh Kavitha dan Ahn (2018) serta Kavitha et al. (2017) yang telah membuktikan ciri-ciri morfologi tersebut adalah berkesan dan relevan dalam mengenalpasti ciri morfologi koloni sel stem pluripoten.

Melalui kaedah pemprosesan imej digital secara automasi, data kuantitatif yang lebih besar boleh diekstrak dalam masa tertentu berbanding kaedah manual. Kedua, ianya dapat meminimumkan kesilapan operator dan ralat dalam pemprosesan dan pengumpulan data. Hal ini disebabkan oleh kaedah yang seragam secara automasi dapat memberikan analisa yang konsisten dari masa ke masa. Di samping itu, kaedah ini juga boleh mengurangkan beban kerja kakitangan di mana, semasa analisa UPK dilakukan, kakitangan makmal bebas melakukan kerja makmal yang lain.

Tambahan pula, sistem automasi kaedah pemprosesan imej digital yang telah ditetapkan dapat mengurangkan kos. Hal ini disebabkan banyak tugas dapat dilakukan melalui kaedah automasi dan mengurangkan keperluan kakitangan di makmal. Sistem ini dapat berjalan semalaman atau dijalankan secara automasi pada hujung minggu, menjimatkan lebih banyak masa dan usaha manusia, sekaligus mempercepat proses analisis data. Hasilnya dapat dipercayai, dan algoritma dapat digunakan selamalamanya (Dee Lawlor 2018).

1.3 PERSOALAN KAJIAN

Adakah kaedah pemprosesan imej digital berupaya mengenalpasti jenis unit pembentuk koloni sel progenitor berketurunan mieloid iaitu UPK-GM, UPK-G dan UPK-M melalui pengekstrakan ciri morfologi UPK?

1.4 HIPOTESIS KAJIAN

Kaedah pemprosesan imej digital berupaya mengenalpasti jenis unit pembentuk koloni sel progenitor berketurunan mieloid iaitu UPK-GM, UPK-G dan UPK-M melalui pengekstrakan ciri morfologi UPK.

1.5 OBJEKTIF KAJIAN

1.5.1 Objektif umum

Mengkaji ciri morfologi unit pembentuk koloni sel progenitor berketurunan mieloid dan membezakan jenis UPK progenitor mieloid yang berlainan komitmen pembezaan iaitu UPK-G, UPK-M dan UPK-GM dengan menggunakan kaedah pemprosesan imej digital secara automasi.

1.5.2 Objektif khusus

- a) Menenalpasti penetapan yang optimum bagi perolehan imej unit pembentuk koloni sel progenitor hematopoietik mencit bagi keturunan mieloid.
- b) Menenalpasti ciri morfologi unit pembentuk koloni sel progenitor berketurunan mieloid menggunakan kaedah pemprosesan imej digital secara automasi.
- c) Menentukan ciri morfologi optimum yang berupaya membezakan jenis unit pembentuk koloni sel progenitor mieloid yang berlainan komitmen pembezaan iaitu UPK-G, UPK-M dan UPK-GM.

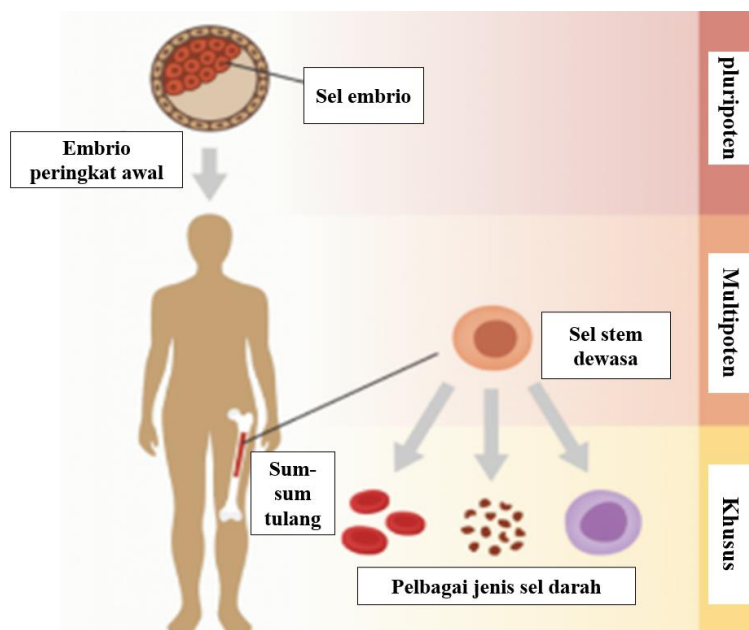
BAB II

KAJIAN KEPUSTAKAAN

2.1 SEL STEM

Sel stem merupakan sel yang boleh memperbaharui diri sendiri, sel yang dapat berubah menjadi banyak jenis sel yang berbeza dan dapat membentuk semua tisu dan organ di dalam badan kita apabila keadaan yang tepat disediakan. Sel stem dapat dibahagikan kepada tiga jenis iaitu sel stem dewasa, *induced* sel stem pluripoten (sel iPS) dan sel stem embrio. Sel-sel yang belum dibezakan ini, mempunyai keupayaan pembaharuan diri, pembahagian tidak terhad dan dapat berubah menjadi organ dan tisu. Sel stem dewasa dijumpai di banyak tisu dan organ di dalam badan dan apabila berlaku kerosakan, mereka membiak pada kedudukan tersebut untuk memperbaiki kawasan yang rosak (Hayretdag & Coskunpinar 2019). Sel stem dewasa adalah multipoten, bermakna sel stem tersebut hanya boleh berubah menjadi beberapa jenis sel di dalam badan, contohnya, SSH hanya membeza kepada jenis sel dalam darah (Scadden 2019).

Sel stem embrio membekalkan sel baru untuk embrio semasa ia membesar dan berkembang menjadi bayi. Sel stem ini dikatakan bersifat pluripoten, yang bermaksud mereka boleh berubah menjadi apa-apa sel di dalam badan (Lerou & Daley 2005). Sel iPS merupakan sel stem yang dihasilkan dalam makmal. '*Induced*' bermaksud bahawa sel stem tersebut dihasilkan di makmal melalui cara pengambilan sel matang normal, seperti sel kulit atau sel darah, dan diprogramkan semula sel matang tersebut melalui modifikasi genetik untuk menjadi sel stem. Sel iPS merupakan sel stem pluripoten bermakna ia boleh menjana pelbagai jenis sel di dalam badan seperti sel stem embrio (Glicksman 2018). Rajah 2.1 menunjukkan jenis sel stem embrio dan sel stem dewasa.



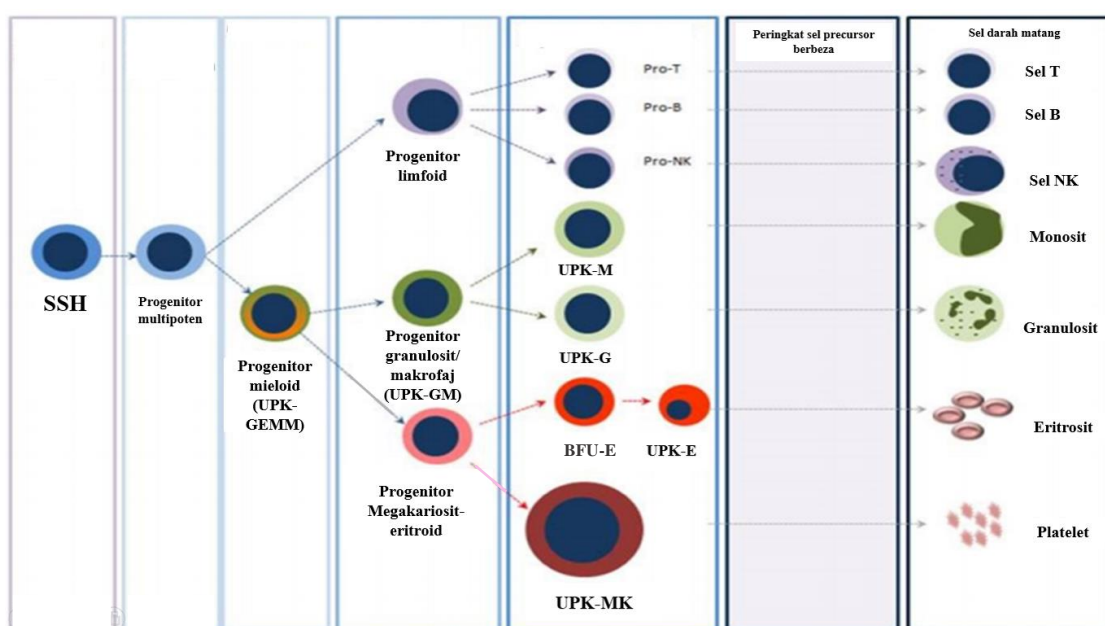
Rajah 2.1 Jenis sel stem embrio dan sel stem dewasa

2.2 SEL STEM HEMATOPOIETIK DAN SEL STEM PROGENITOR HEMATOPOIETIK

Semasa perkembangan janin dan di sum-sum tulang dewasa, SSH mengalami pembaharuan diri, pembahagian sel dan proliferasi untuk menghasilkan progenitor SSH. Proses pengekalan fungsi peredaran darah ini dipanggil sebagai hematopoiesis. Homeostasis sistem darah disokong oleh sel hematopoietik dan sel progenitor. Melalui proses ini, SSH boleh dibezakan kepada sel darah yang mengawal fungsi imun, pembekuan darah dan pembekalan oksigen (Wilkinson & Yamazaki 2018). Sistem hematopoietik mempunyai kemampuan dalam proliferasi dan pembezaan untuk memenuhi keperluan fisiologi hematopoiesis. SSH memainkan peranan penting dalam mempertahankan kehidupan mamalia kerana sel darah matang mempunyai jangka hayat yang sangat pendek (Kumar et al. 2019 ; Wei & Frenette 2018 ; Wognum et al. 2013).

Semua sel darah berasal dari SSH yang tinggal di sum-sum tulang, mampu membaharukan diri dan melakukan pembezaan untuk menjadi pelbagai progenitor multipoten, oligopoten, atau unipoten. Progenitor menjalankan proses proliferasi dan pembezaan menjadi pelbagai jenis sel matang yang berfungsi sepenuhnya di sum-sum tulang atau berhijrah ke organ hematopoietik atau limfoid lain. Proliferasi yang progresif dan langkah pembezaan menghasilkan pengeluaran sel darah matang termasuk sel limfoid T dan B, sel NK, sel dendritik, monosit, granulosit, sel darah merah,

dan platelet (Wognum et al. 2013). Bilangan atau jisim sel keturunan dikawal oleh keseimbangan antara kadar pembaharuan diri dan proses apoptosis. Sebarang ketidakseimbangan dalam salah satu parameter ini akan mengakibatkan peningkatan atau penurunan jisim sel progenitor (Alenzi et al. 2009). Rajah 2.2 menunjukkan carta keseluruhan proses hematopoiesis yang mana bermula dari pembezaan SSH yang menghasilkan populasi progenitor multipoten yang terdiri daripada progenitor mieloid dan progenitor limfoid sehingga pelbagai jenis sel matang.



Rajah 2.2 Pembahagian sel stem hematopoietik

Sumber: Skific & Golemovic 2019

SSH yang mempunyai kemampuan dalam pembaharuan sendiri apabila berada di puncak hierarki perkembangan hematopoietik, sehingga menghasilkan sejumlah progenitor multipoten. Progenitor multipoten seterusnya membeza kepada progenitor oligopoten termasuk progenitor limfoid (CLP) dan progenitor mieloid (CMP). Setiap progenitor berupaya untuk melakukan pembezaan menjadi sel-sel yang matang. Progenitor limfoid (CLP) membeza kepada sel limfosit B dewasa, limfosit T, dan sel NK manakala progenitor mieloid (CMP) membeza menjadi monosit dan granulosit, serta progenitor megakariosit atau eritrosit, yang membeza menjadi platelet dan eritrosit. Kedua-dua progenitor mieloid dan progenitor limfoid juga membeza kepada sel dendritik (Bryder et al. 2006).

2.3 APLIKASI SEL STEM HEMATOPOIETIK

SSH mengekalkan pembentukan darah atau hematopoiesis seumur hidup dan juga digunakan secara klinikal dalam transplantasi sum-sum tulang, terapi selular kuratif untuk pelbagai penyakit hematologi dan terapi kanser. SSH dipelihara sepanjang kehidupan orang dewasa oleh persekitaran mikro, yang terdiri daripada pelbagai komponen selular, molekul, dan metabolik. Sistem darah atau hematopoietik berperanan penting dalam kesihatan dan penyakit manusia. Kegagalan sistem darah homeostasis mengakibatkan pelbagai penyakit manusia, dari anemia dan hemofilia, hingga kekebalan tubuh dan alergi, atau leukemia dan limfoma (Wilkinson & Yamazaki 2018). Kegunaan dan fungsi SSH dalam badan manusia tidak boleh diabaikan. Dengan itu, banyak saintis telah menjalankan pelbagai jenis kaedah penyelidikan untuk membuktikan aplikasi SSH dalam terapi klinikal. Pemindahan sum-sum tulang atau pendermaan SSH merupakan terapi yang sangat popular di dalam kegunaan klinikal untuk rawatan penyakit hematologi, rawatan kanser dan rawatan regeneratif (Hatzimichael & Tuthill 2010).

Transplantasi sum-sum tulang klinikal bermula pada tahun 1957 dan kebanyakan pesakit mati pada masa itu kerana masih kekurangan pengetahuan tentang SSH, tindak balas imun terhadap pemindahan atau identiti antigen pemindahan (Simpson & Dazzi 2019). Banyak kaedah penyelidikan telah dijalankan lebih lanjut untuk memajukan pengetahuan dan membuktikan keupayaan SSH dalam menyusun semula seluruh darah sistem dan mengekalkan hematopoiesis secara jangka panjang setelah pemindahan sum-sum tulang dilakukan kepada penerima. Ini adalah asas klinikal dalam transplantasi sum-sum tulang atau SSH, yang merupakan terapi kuratif untuk pelbagai penyakit hematologi (Wilkinson & Yamazaki 2018). Pemindahan SSH yang sihat dari sum-sum tulang adalah pilihan rawatan utama untuk penyakit hematopoietik. SSH dari sum-sum tulang dewasa dapat membina semula dan menggantikan sistem hematopoietik penerima selepas proses pemindahan (Nakamura-Ishizu et al. 2020). SSH yang normal boleh berfungsi secara berterusan sebagai sumber sel darah dari semua keturunan untuk merawat penyakit hematopoietik secara kekal sepanjang hayat (Morgan et al. 2017).

Pemindahan SSH juga berkesan dalam rawatan atau perubatan regeneratif. Perubatan regeneratif berfaedah dalam tujuan penjagaan kesihatan keutamaannya untuk memperbaiki dan mengganti sel, tisu atau organ yang berpenyakit supaya dapat memulih fungsi badan. Keupayaan regeneratif SSH bergantung pada potensi unik sel stem untuk menjana semula keseluruhan sistem SSH, termasuk semua sel keturunan dan sel matang, serta menjana semula sel darah yang rosak (Egeler et al. 2011). Rawatan kanser juga boleh dicapai melalui pemindahan SSH melalui kaedah autologus atau alogenik untuk merawat kanser hematologi atau keadaan pramalignan seperti leukemia akut, mieloma berbilang, *Hodgkin* dan bukan *Hodgkin* limfoma. SSH juga berjaya digunakan untuk rawatan penyakit autoimun seperti anemia hemolitik, aplasia sel darah putih, aplasia sel darah merah, trombositopenia idiopatik dan sindrom Evans (Tripura & Pande 2013).

Mekanisme dan dinamik selular berdasarkan homeostasis hematopoietik telah menjadi tumpuan utama bagi komuniti saintifik sejak penemuan SSH yang mampu mengekalkan hematopoiesis sepanjang hayat selepas pemindahan. Kemajuan teknologi yang dicapai telah meningkatkan pemahaman mengenai dinamik hematopoietik pada manusia (Scala & Aiuti 2019). Hasil kajian yang novel dari penyelidikan sel stem secara berterusan akan menyempurnakan dan menambahbaik rawatan pada masa sekarang dan akan datang (Ng & Alexander 2017).

2.4 KEPENTINGAN PENGANALISA CIRI MORFOLOGI DALAM BIDANG BIOLOGI

Analisis morfologi memainkan peranan yang penting dalam bidang biologi, contohnya analisis morfologi membolehkan penelitian terhadap organisasi selular dan keadaan fisiologi sel. Oleh itu, ia dapat digunakan sebagai ukuran kualitatif dan kuantitatif dari pelbagai asai biologi. Kajian mengenai analisis morfologi telah mendapat banyak perhatian dengan peningkatan permintaan dalam bidang bioinformatik dan aplikasi bioperubatan. Antaranya diagnosis penyakit, analisis dan statistik terhadap morfologi sel memberikan sumbangan yang baik dalam bidang biologi. Hal ini kerana, analisis morfologi sel adalah penting dalam mengenalpasti dan klasifikasi keadaan yang tidak normal, pengesanan kanser, dan analisis perubahan dinamik di bawah persekitaran tertentu. Contohnya, hasil daripada morfologi sel analisa memberi manfaat kepada ahli

patologi dalam membuat diagnosis akhir dan memberikan pemerhatian pantas. Dalam 20 tahun terkini, sekitar 1000 penerbitan telah melaporkan penggunaan analisis morfologi dalam penyelidikan bioperubatan. Penelitian yang relevan meliputi aplikasi yang agak luas, seperti segmentasi gumpalan sel, pengekstrakan ciri morfologi, pengenalpastian sel yang tidak normal, analisis statistik dan sebagainya (Chen et al. 2012).

2.5 PENGHASILAN UNIT PEMBENTUK KOLONI HEMATOPOIETIK

2.5.1 Asai unit pembentuk koloni hematopoietik

SSH boleh diasingkan dari darah periferai, sum-sum tulang atau darah tali pusat dan menghasilkan kumpulan keturunan heterogen yang dapat dikesan in vitro dengan menggunakan asai unit pembentuk koloni (UPK). Asai UPK adalah asai jangka pendek yang digunakan untuk pengesanan keaktifan fungsi sel progenitor hematopoietik dalam keadaan in vitro (Skific & Golemovic 2019). Asai UPK hematopoietik telah digunakan secara meluas dalam penyelidikan dan aplikasi klinikal sebagai kaedah pengukuran dan penilaian progenitor hematopoietik (Wognum et al. 2013).

Sel-sel progenitor hematopoietik bercambahan dan berbeza untuk menghasilkan koloni sel-sel yang matang apabila dikultur dalam medium berasaskan separa pepejal agar metilselulosa yang ditambah dengan faktor pertumbuhan yang sesuai. Asai UPK untuk sel progenitor manusia memerlukan tempoh kultur sekurang-kurangnya 14 hari untuk membolehkan pertumbuhan dan pembezaan optimum bilangan UPK secara maksimum dalam penyediaan sel (Wognum et al. 2013).

Asai UPK ini digunakan untuk menilai integriti fungsi sel hematopoietik, mengkaji sifat biologi progenitor hematopoietik dalam bidang kesihatan dan penyakit, memeriksa keberkesanan dan ketoksikan ubat baru pada SSH. Tatacara piawai dalam asai UPK adalah kultur sampel dalam matriks separa pepejal yang ditambah dengan sitokin yang sesuai selama 7–14 hari. Penggunaan faktor pertumbuhan rekombinan mengeluarkan hasil UPK keturunan hematopoietik mieloid, eritroid, dan keturunan platelet secara optimum (Pereira et al. 2017).

Metilselulosa merupakan media yang paling sesuai dalam asai UPK kerana metilselulosa memberikan kelikatan optimum sesuai dalam pembentukan koloni. Selanjutnya, metilselulosa juga adalah lengai secara kimia dan stabil di persekitaran walaupun dalam keadaan perubahan pH (Skific & Golemovic 2019). Metilselulosa merupakan polimer lengai yang membentuk gel stabil dengan kejelasan optik yang baik pada tahap kepekatan sebanyak 0.9-1.5% (Wognum et al. 2013).

Pembezaan SSH kepada pelbagai jenis sel darah dikawalatur oleh pengaruh hormon serta bergantung kepada faktor pertumbuhan yang digunakan (Metcalf 1998). Contohnya, faktor sel stem (SCF), trombopoietin (TPO), interleukin-3 (IL-3), interleukin-6 (IL-6), faktor perangsang koloni-GM, dan faktor perangsangan koloni-G menyokong proliferasi progenitor multipoten yang belum matang. Sitokin lain, termasuk eritropoietin (Epo), interleukin-7 (IL-7), dan faktor perangsang koloni-M lebih spesifik untuk pengembangan garis keturunan sel individu, contohnya, keturunan eritroid, limfoid, atau makrofaj (Wognum et al. 2013).

2.5.2 Unit pembentuk koloni (UPK)

Koloni yang dihasilkan oleh pelbagai jenis sel keturunan atau sel-sel progenitor yang multipoten dikenalpasti dan dinilai berdasarkan kriteria morfologi (Veilier et al. 2019). Bilangan dan morfologi koloni memberikan maklumat mengenai kemampuan progenitor untuk membeza dan menjalankan proliferasi. Dalam proses pertumbuhan UPK, 14 hari merupakan jangka masa piawai untuk mengembangkan koloni supaya mendapat ukuran yang tepat and mudah dianalisis (Kronstein-Wiedemann & Tonn 2019).

Majoriti UPK hematopoietik yang dikultur memerlukan tempoh selama 14 hari untuk mencapai bilangan dan ukuran maksimum supaya morfologi koloni dapat dikenalpasti. Sekiranya maklumat mengenai jumlah koloni diperlukan dalam tempoh yang pendek, asai UPK boleh dilakukan dengan menggunakan media yang membolehkan pertumbuhan koloni dalam jangka masa yang lebih pendek iaitu selama tujuh hari. Namun, dalam asai yang koloninya ditumbuhkan dalam masa selama tujuh hari, jenis koloni tidak dapat dikenalpasti disebabkan koloni masih kecil dan kurang mengandungi ciri pembezaan (Pereira et al. 2007 ; Skific & Golemovic 2019).

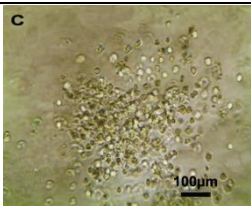
Unit pembentuk koloni granulosit, eritroid, monosit, dan megakariosit (UPK-GEMM) adalah SSH yang paling primitif. Ia mampu menghasilkan sel pelbagai keturunan iaitu granulosit, eritrosit, monosit, dan megakariosit. Selain itu, sel-sel keturunan yang lebih komited hanya mempunyai potensi keturunan tunggal. Ini adalah unit pembentuk koloni-granulosit (UPK-G), unit pembentuk koloni-makrofaj (UPK-M), *burst forming unit-E* (BFU-E), dan unit pembentuk koloni-megakariosit (UPK-Meg) yang mana masing-masing menghasilkan granulosit, makrofaj, eritrosit, atau megakariosit. Dalam asai UPK yang dikultur selama 14 hari, UPK-GM biasa terdiri daripada sekurang-kurangnya 40 granulosit dan sel makrofaj yang biasanya tersebar dari tengah koloni. BFU-E dan UPK-E lebih mudah dikenali kerana warna merah atau warna kecoklatan yang berasal dari hemoglobin. Koloni UPK-GEMM selalunya besar dan mengandungi kedua-dua sel dari keturunan eritroid dan bukan eritroid termasuk granulosit, makrofaj dan megakariosit (Skific & Golemovic 2019).

2.6 KAEDAH PENGKELASAN MORFOLOGI UNIT PEMBENTUK KOLONI

2.6.1 Analisis koloni secara manual

Di dalam kajian ini, fokus diberikan kepada tiga jenis UPK bagi progenitor mieloid iaitu UPK-GM, UPK-G, dan UPK-M. Analisis dan pengkelasan ciri-ciri morfologi koloni biasa dilakukan secara manual oleh kakitangan yang terlatih melalui mikroskop songsang dan grid (Skific & Golemovic 2019). Jadual 2.1 di bawah menunjukkan pengkelasan UPK progenitor berketurunan mieloid dan ciri-ciri morfologi UPK. Sumber gambar diambil sebagai rujukan daripada kajian Xu et al. (2012).

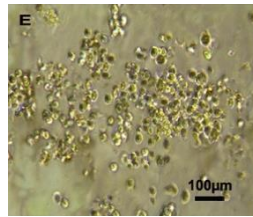
Jadual 2.1 Pengkelasan unit pembentuk koloni progenitor berketurunan mieloid dan deskripsi ciri-ciri morfologi unit pembentuk koloni

Jenis unit pembentuk koloni	Imej unit pembentuk koloni	Deskripsi ciri-ciri morfologi unit pembentuk koloni
UPK-GM		<ul style="list-style-type: none"> ▪ Berwarna jernih ▪ Bentuk bulat (granulosit) dan bujur (makrofaj) ▪ Lebih pekat pada bahagian teras (<i>central core</i>)

bersambung...

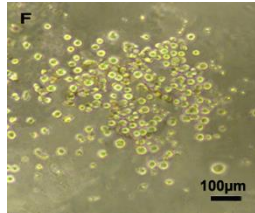
sambungan...

UPK-G



- Warna lebih cerah
- Bentuk sel bulat
- Saiz sel lebih kecil daripada makrofaj

UPK-M



- Sentroid berwarna kelabu
- Bentuk sel bulat dan bujur
- Tekstur kasar

Sumber: Xu et al. 2012

Walaupun begitu, analisis melalui kaedah manual membawa banyak kesulitan dalam menghasilkan keputusan yang tepat. Hal ini disebabkan keputusan analisis ciri-ciri morfologi amat subjektif dan membawa variasi antara individu dalam makmal (Kim et al. 2013). Analisa morfologi koloni SSH secara manual memerlukan masa yang panjang, menambahkan beban kerja kakitangan makmal dan berkemungkinan besar menghasilkan keputusan ralat atas kesalahan manusia dalam proses evaluasi dan analisis (Khojasteh et al. 2015 ; Kim et al. 2013; Mahalingaiah et al. 2018). Kakitangan atau pakar terlatih yang banyak juga diperlukan dalam menganalisis morfologi koloni kerana pakar-pakar perlu bekerjasama dalam penghasilan keputusan yang tepat (Pinidiyaarachchi 2009).

2.6.2 Instrumen automasi analisis unit pembentuk koloni yang sedia ada

Baru-baru ini, alat pengimejan automatik dan alat perisian yang digunakan untuk mengenalpasti, mengelaskan dan mengira koloni hematopoietik telah dikembangkan. Sistem automatik ini telah dirancang dengan tujuan untuk mendapat keputusan analisis koloni dengan lebih tepat, menjimatkan masa dan meningkatkan kualiti penghasilan kerja. Walaupun ini adalah langkah maju dalam penyeragaman hasil koloni dari asai UPK, hanya ada satu jenis alat automatik yang tersedia secara komersial buat masa ini iaitu STEMvisionTM (Skific & Golemovic 2019). STEMvisionTM merupakan instrumen automatik yang pertama untuk pengimejan koloni hematopoietik untuk mengatasi masalah limitasi manual and menghasilkan keputusan yang lebih tepat (Veilier et al.

2019). Rajah 2.3 di bawah telah menunjukkan mesin STEMvision™ iaitu instrumen automasi analisis unit pembentuk koloni hematopoietik.



Rajah 2.3 Mesin STEMvision™

Untuk meningkatkan ketepatan dalam analisis koloni yang dihasilkan dari asai UPK, instrumen STEMvision™ telah dikembangkan. STEMvision™ merupakan instrumen yang menggunakan perisian analisis gambar untuk mengenalpasti, mengklasifikasikan dan mengira koloni yang dihasilkan oleh eritroid, mieloid dan progenitor multipoten dalam sum-sum tulang, darah tali pusat, dan darah perifer (Egeler et al. 2013). Berdasarkan kaedah penyelidikan oleh Egeler et al. (2013) telah menunjukkan STEMvision™ lebih produktif berbanding dengan kaedah manual dalam mengenalpasti dan pengiraan koloni SSH. Hasilnya dapat dikumpul secara visual dan dieksport ke pangkalan data. Imej asai UPK boleh diperoleh dalam masa kira-kira 30 saat. Analisis gambar dan penghitungan koloni dilakukan dalam masa lebih kurang 3 min. Kelajuan, ketepatan dan keboleholuan melalui penggunaan instrumen STEMvision™ memudahkan analisis hasil asai UPK dalam makmal penyelidikan dan klinikal, serta bank darah tali pusat.

Walaupun STEMvision™ boleh digunakan untuk mengira dan mengelaskan koloni hematopoietik namun pengklasifikasiannya tidak spesifik. STEMvision™ hanya boleh mengelaskan koloni BFU-E, UPK-E, UPK-GEMM dan UPK-GM. Namun, ia tidak berupaya untuk mengelaskan antara UPK-GM, UPK-G dan UPK-M dalam progenitor keturunan mieloid. Bukan itu sahaja, STEMvision™ juga tidak berupaya untuk menganalisa koloni daripada progenitor keturunan pre-B limfosit. Di samping itu, SSH perlu dikultur menggunakan media yang spesifik dan kelengkapan proses kultur

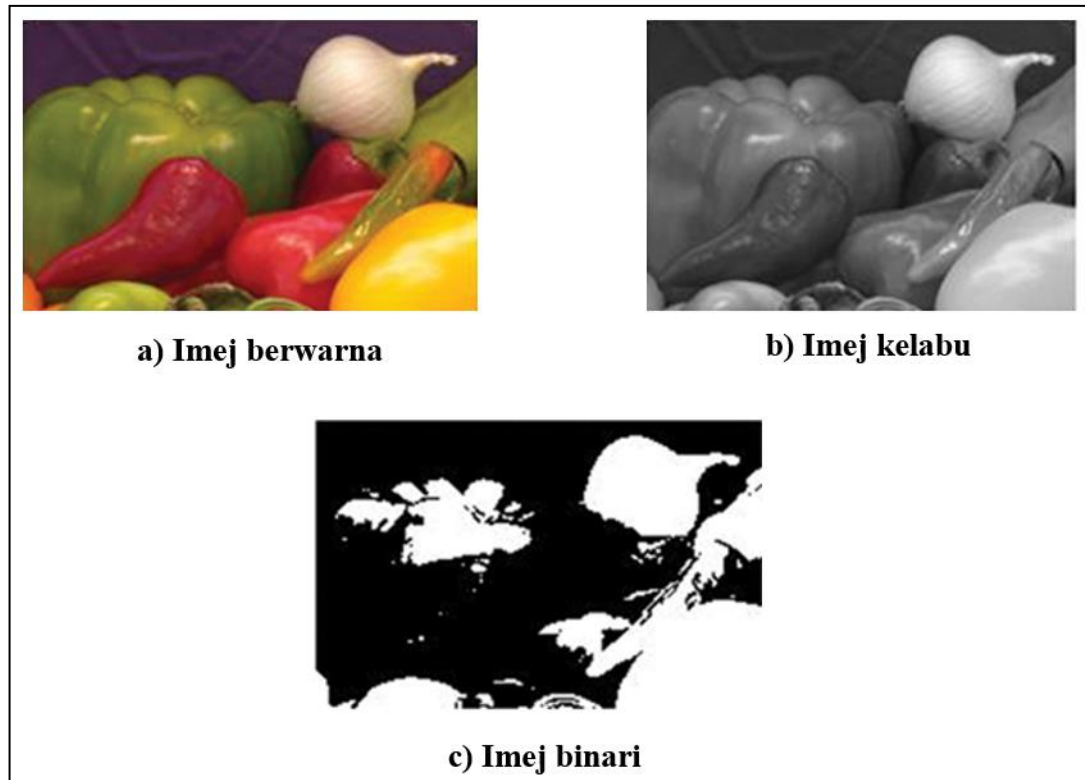
yang dikeluarkan oleh syarikat yang sama menyebabkan penggunaan instrumen ini tidak fleksibel (Egeler et al. 2013 ; Halpenny et al. 2015 ; Kronstein-Wiedemann & Tonn 2019).

2.7 ASAS PEMROSESAN IMEJ DIGITAL

Pada pertengahan tahun 1970-an, dengan perkembangan pesat dalam bidang sains komputer dan buatan kepintaran, teknologi pemprosesan imej digital telah berkembang kepada tahap yang lebih tinggi (Meng 2018). Dengan kemajuan perisian pemprosesan imej digital dan alat penyuntingan, imej digital yang berkualiti menjadi lebih mudah diperoleh dan dimanipulasi. Pengesanan manipulasi imej sangat penting kerana imej dapat digunakan sebagai sah dan bukti, dalam penyelidikan forensik atau bidang-bidang lain (Ansari et al. 2014). Perolehan imej adalah langkah pertama dari mana-mana sistem mesin penglihatan (Dutta et al. 2013). Pemprosesan imej digital adalah bidang menarik yang mengkaji pelbagai teknik pemprosesan terhadap imej digital, yang menjadi asas komunikasi visual. Pemprosesan imej digital memproses imej digital dengan pelbagai jenis teknik seperti pemulihan, pra-pemprosesan, segmentasi dan lain-lain. Penghasilan pemprosesan imej digital boleh menjadi sekumpulan ciri atau parameter yang berkaitan dengan imej (Abdullah et al. 2016). Pada zaman ini, pemprosesan imej digital memainkan peranan penting dalam kehidupan seharian termasuk komunikasi multimedia, diagnostik perubatan, astronomi, ramalan cuaca dan pengenalan cap jari untuk aplikasi dalam bidang keselamatan (Epiphany 2014).

2.7.1 Imej digital

Imej digital merupakan suatu imej yang dapat dilihat sebagai fungsi $f(x, y)$, yang mana x dan y adalah koordinat spatial. Nilai f pada mana-mana koordinat (x, y) dipanggil sebagai piksel. Semasa diproses secara digital, imej tersebut mesti diubah menjadi matriks nombor supaya nombor ini dapat dikira secara digital dan dimanipulasi melalui perisian (Silva & Mendonca 2005). Piksel boleh didefinisikan sebagai elemen terkecil yang dapat dialamatkan dalam imej digital (Sinecen 2016). Rajah 2.4 di bawah menunjukkan jenis imej digital.



Rajah 2.4 Jenis imej digital

Sumber: Sinecen 2016

Dalam imej digital, terdapat beberapa jenis imej digital iaitu imej binari, kelabu dan warna (Rajah 2.4). Imej binari adalah imej yang mempunyai dua piawai potensi yang berbeza untuk setiap piksel. Imej binari mempunyai dua jenis warna piksel iaitu nilai piksel kosong (0) mewakili hitam dan nilai piksel satu (1) mewakili putih. Nilai piksel kosong mewakili latar belakang manakala nilai piksel satu mewakili latar depan. Imej kelabu mengukur kecerahan keamatan cahaya sesuatu objek dalam imej digital berdasarkan koordinat (x, y) . Piksel dalam skala kelabu adalah penting untuk menunjukkan kapasiti kecerahan imej kelabu. Julat bagi aras kelabu adalah antara nilai 0-255. Semakin tinggi nilai aras kelabu, semakin cerah imej tersebut pada koordinat (x, y) tertentu. Piksel imej berwarna mempunyai nilai merah, hijau, dan biru (Mohan et al. 2016 ; Sinecen 2016). Rajah 2.5 di bawah menunjukkan imej RGB (*Red, Blue, Green*) dengan piksel berwarna.



Rajah 2.5 Imej RGB dengan piksel berwarna

Sumber: Sinecen 2016

2.7.2 Segmentasi imej

Segmentasi imej adalah proses mengenalpasti kawasan homogen dalam imej digital. Ia juga merupakan proses pemisahan imej kepada kawasan yang berkepentingan supaya menjadi homogen dan tidak bersambung berdasarkan kepada beberapa ciri seperti warna, tekstur, dan lain-lain (Dijkstra 1994). Imej segmentasi juga merupakan satu bidang analisis imej, digunakan untuk mengelompokkan piksel ke dalam satu kawasan untuk menentukan komposisi imej. Algoritma segmentasi berdasarkan salah satu daripada dua sifat asas nilai intensiti diskontinuiti dan kesamaan. Kategori pertama adalah membahagi imej berdasarkan perubahan intensiti. Kategori kedua adalah berdasarkan pemisahan imej ke kawasan yang serupa mengikut kriteria yang telah ditentukan (Al-amri et al. 2010).

Ambang adalah salah satu kaedah yang banyak digunakan untuk segmentasi imej. Pemilihan ambang optimum adalah proses penting dalam bahagian segmentasi imej (Epiphany 2014). Kaedah ini berguna dalam membezakan latar depan daripada latar belakang imej. Dengan memilih nilai ambang T yang mencukupi, imej tahap kelabu boleh ditukar kepada imej binari. Imej binari harus mengandungi semua maklumat penting mengenai kedudukan dan bentuk objek minat (latar depan).

Kelebihan dalam memperoleh imej binari adalah mengurangkan kerumitan data dan mempermudah proses pengiktirafan dan pengkelasan. Cara yang paling biasa untuk menukar imej tahap kelabu menjadi imej binari adalah memilih satu nilai ambang (T). Maka semua nilai tahap kelabu di bawah nilai ambang (T) ini akan dikelaskan sebagai kategori hitam (0), dan yang di atas nilai ambang (T) akan berwarna putih (1) (Al-amri et al. 2010). Rajah 2.6 menunjukkan contoh segmentasi imej dari imej asal.



Rajah 2.6 Segmentasi imej (kanan) dari imej asal (kiri)

Sumber: Thakur & Ranjan 2019

Dalam kajian ini, kaedah ambang otsu (*otsu thresholding*) akan digunakan dalam segmentasi imej sel stem koloni. Kaedah ini memberikan hasil yang memuaskan apabila nilai piksel di setiap kelas saling berdekatan. Kaedah ambang otsu adalah kaedah ambang yang paling banyak dirujuk, kerana ia beroperasi secara langsung pada tahap kelabu histogram, jadi cepat dan mengira nilai ambang yang dioptimumkan. Ia merupakan salah satu algoritma binarisasi yang melakukan ambang imej berasaskan kluster secara automasi. Dalam pemprosesan imej, kaedah ambang otsu digunakan untuk membezakan tahap binarisasi secara automatik berdasarkan bentuk histogram. Algoritma menganggap imej yang disegmentasi tersebut terdiri daripada dua kelas asas iaitu latar depan dan latar belakang (Bangare et al. 2015).

2.8 PENGEKSTRAKAN IMEJ DAN ANALISA

Selepas imej melalui fasa segmentasi, proses pengekstrakan ciri dapat dilakukan. Ciri yang ingin dikaji dalam kajian ini adalah ciri morfologi UPK progenitor mieloid. Peningkatan dan pengekstrakan maklumat berguna daripada imej digital memainkan peranan penting dalam kebanyakan bidang saintifik dan kejuruteraan. Terdapat banyak alat dan pakej perisian yang tersedia untuk pemprosesan imej. Walau bagaimanapun,

pengekstrakan ciri memerlukan pengembangan algoritma khusus bergantung pada kekhususan imej dan jenis data yang perlu diambil daripada imej. MATLAB adalah platform terkemuka untuk pengkomputeran teknikal dan merupakan salah satu perisian yang paling banyak digunakan untuk penciptaan algoritma pengekstrakan ciri. Kotak alat pemprosesan imej dalam MATLAB mengandungi hampir beribu-ribu fungsi yang biasa berkaitan dengan bidang ini, termasuk fungsi memproses, analisis, segmentasi, dan pasca pemprosesan imej digital (Cazacu 2021).

MATLAB memberikan sokongan untuk vektor dan operasi matriks yang menjadi asas penyelesaian masalah kejuruteraan dan saintifik, memantaskan pembangunan dan pelaksanaan. Dengan penggunaan MATLAB, program dan algoritma dapat dikembangkan dengan lebih cepat daripada platform tradisional. Jadi, satu baris kod MATLAB boleh ganti beberapa baris kod C atau C++. MATLAB juga menyediakan ciri-ciri bahasa pengaturcaraan tradisional, seperti kawalan aliran, pengendalian ralat, dan berorientasi objek pengaturcaraan (Epiphany 2014). Dalam kajian ini, kaedah yang digunakan untuk mengekstrak ciri morfologi UPK progenitor mieloid ialah *regionprops*, iaitu salah satu alat pemprosesan imej dalam MATLAB. *Regionprops* mengukur sifat yang berbeza dalam imej, seperti luas, paksi dan pusat (Buksh et al. 2014). Di bawah *regionprops*, sebelas ciri morfologi akan dianalisa supaya ciri yang paling relevan dan tepat untuk pengekstrak UPK progenitor keturunan mieloid dapat dikenalpasti. Antara sebelas ciri morfologi yang dikaji termasuk eksentrik, sentroid (x-koordinat), sentroid (y-koordinat), orientasi, kepanjangan major axis, kepanjangan minor axis, kawasan, perimeter, diameter setara, kekukuhan dan keluasan. Selepas pengumpulan data ciri morfologi UPK progenitor berketurunan mieloid, data akan seterusnya dianalisa melalui perisian SPSS.

BAB III

KAEDAH KAJIAN

3.1 BAHAN-BAHAN

Semua bahan dan radas yang disenaraikan adalah berpandukan kepada analisa asai unit pembentuk koloni dan pengimejan koloni yang dijalankan.

3.1.1 Bahan kimia

Dalam penyelidikan ini, medium yang digunakan untuk pertumbuhan SSH ialah faktor *Dulbecco's modified eagle's medium* (DMEM) (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, Amerika Syarikat). Faktor pertumbuhan yang digunakan untuk sel stem progenitor hematopoietik (SSPH) termasuk, serum anak lembu (FBS) (JRS Scientific Inc., Wooland, Kanada), penisilin/streptomisin (PAA Laboratories GmbH, Pasing, Australia), faktor sel stem mencit (SCF), interleukin-3 (IL-3), dan interleukin-6 (IL-6) (Mitenyi Biotec, Bergisch, Jerman). Salin penimbal fosfat (PBS) dan serbuk tripan biru dibeli dari syarikat Sigma Chemical Co (St. Louis, MO, Amerika Syarikat). Media metilselulosa yang digunakan bagi asai UPK iaitu Methocult GF M3534 yang dibeli dari syarikat StemCell Technologies (Vancouver, British Columbia, Kanada).

3.1.2 Alat radas

Alat radas yang digunakan dalam penyelidikan ini adalah pipetboy (Thermo Scientific, Amerika Syarikat), plat enam telaga (Jet Biofil, Kanada), pipet serologi (Jet Biofil, Kanada), mikropipet (Eppendorf, Jerman), tiub pengempar (Eppendorf, Jerman), kelalang kultur T 25 cm² (Advantec, Jepun), alat penuras media (Nalgene, Amerika Syarikat), parafilm (Parafilm M, Amerika Syarikat), botol Schott, silinder penyukat dan kelalang kon (Schott Duran, Jerman). Alat radas lain seperti botol universal,

picagari 5 ml bersambung dengan jarum bersaiz 25 gauge, penyaring sel 40 μ m, piring petri, tip mikropipet, tiub 1.5 ml, dan piring penimbang juga digunakan.

Mesin yang digunakan adalah mikroskop sonsang (Model NKX41, Syarikat Olympus, Jepun), inkubator dengan 37 °C, CO₂ 5% (Model Galaxy-S dan Model Galaxy-R, Syarikat RS Biotech, United Kingdom), alat pemanas rendam (Syarikat Memmert, Jerman), ketuhar (Model BS100, Syarikat Memmert, Jerman), pengempar (Model Rotofix 32, Syarikat Hettich Zentrifugen, United Kingdom), pengocang elektrik Maxi Mix II (Model Type 37600 Mixer, Syarikat Barnstead Thermolyne, Amerika Syarikat), peti sejuk (Model R-303 em, Syarikat Hitachi, Jepun dan Syarikat Sharp, Jepun), vortex, kebuk aliran lamina (Model AHC-4A1 dan AHC-3A1, Syarikat ESCO, United Kingdom), pengacau magnetik (Model HTS-1003, Syarikat LMS dan Syarikat Favorit, Malaysia), penimbang elektronik (Model ED2245, Syarikat Sartorius, Jerman), dan meter pH (Model SevenEasy, Syarikat Mettler Toledo, Amerika Syarikat).

3.1.3 Mencit ICR

Sebanyak tiga mencit jantan berumur 8-10 minggu strain ICR (*Imprinting Control Region*) dengan berat di antara 25-40 g diperoleh dari Unit Sumber Haiwan, Universiti Kebangsaan Malaysia (UKM). Seterusnya, sangkar polikarbonat dengan kayu tatal sebagai lantai sangkar digunakan untuk menempatkan mencit jantan tersebut. Mencit tersebut dibekalkan dengan makanan mencit dan air minuman di rumah haiwan Fakulti Sains Kesihatan, Universiti Kebangsaan Malaysia (UKM). Suhu persekitaran dikawal supaya berada pada suhu bilik dengan kitaran 12 jam cahaya gelap. Sebelum eksperimen dimulakan, kesemua haiwan diaklimatisasikan kepada persekitaran makmal selama dua minggu. Kesemua prosedur pengendalian haiwan makmal disahkan dan diluluskan oleh Jawatankuasa Etika Haiwan, Universiti Kebangsaan Malaysia (UKMAEC) dengan nombor etika FSK/2019/ZARIYANTEY/25-SEPT./1040-SEPT.-2019-FEB.-2021-AR-CAT2.

3.2 KAEDAH

3.2.1 Penyediaan sel sum-sum tulang (SST) daripada mencit ICR

Dalam kajian ini, mencit jantan strain ICR (*Imprinting Control Region*) dikorbankan untuk mendapatkan SSH segar, berpandukan penerangan oleh Boltz-Nitulescu et al. (1987) dengan pengubahsuaian. Pengorbanan mencit dimulakan melalui teknik dislokasi servikal di dalam rumah haiwan. Sebelum memasukkan mencit ke dalam beg autoklaf, ia disembur dengan alkohol isopropil 70%. Seterusnya, sum-sum tulang (SST) diambil dalam keadaan steril dalam kebuk aliran lamina. Mencit diletakkan di atas piring petri dan bulu mencit dibasahkan dengan alkohol isopropil 70%. Selepas itu, kulit di bawah tulang rusuk dipotong sehingga ke bahagian kaki mencit. Proses ini dilakukan dalam keadaan steril dengan tidak mengotori mencit dengan darah semasa proses pembedahan. Selepas proses pembedahan, salin penimbal fosfat (PBS) dituang ke dalam piring petri yang lain untuk diletakkan femur dan tibia yang telah dipotong dari badan mencit. Langkah seterusnya ialah sendi-sendi femur dan tibia mencit dipotong dan diletakkan ke dalam piring petri yang diisi dengan salin penimbal fosfat (PBS). Piring petri yang steril diambil dan pembersihan tibia dan femur mencit dari sisa kulit, daging dan otot dilakukan sehingga tinggal tulang yang bersih. Seterusnya, tulang yang bersih diletak ke dalam piring petri yang mengandungi PBS.

Isolasi SST yang berada dalam kaviti tulang dijalankan dengan menggunakan teknik pemancuran. Langkah pertama dimulakan dengan menyediakan picagari 5 ml dan DMEM 2% disedut lalu picagari disambungkan dengan jarum yang bersaiz 25 gauge. Kemudian, kedua-dua belah hujung tulang dipotong supaya kaviti tulang terdedah. Jarum yang bersambung dengan picagari 5 ml yang berisi DMEM 2% dimasukkan separuh daripada tulang mencit. Sebanyak 2% DMEM dimasukkan secara perlahan ke dalam tiub pengempar 15 ml. Proses yang sama diulang pada hujung sebelah tulang tersebut sehingga kaviti tulang kelihatan putih. Tiub pengempar 15 ml yang mempunyai sum-sum tulang yang telah diisolasi daripada teknik pemancuran diemparkan pada kelajuan 2500 rpm selama 7 min. Bahagian supernatan dibuang ke dalam botol sisa. Sebanyak 5 ml DMEM 1% dimasukkan ke dalam tiub pengempar 15 ml yang mempunyai mendakan lalu digoncangkan. Penyaring sel diambil dan diletakkan di atas tiub pengempar 50 ml.

Seterusnya, sebanyak 5 ml DMEM 1% diambil daripada tiub pengempar 15 ml yang mempunyai mendakan lalu dititiskan ke atas penyaring sel tersebut. Selepas titisan, penyaring sel tersebut digoncangkan secara perlahan-lahan untuk membolehkan media tersebut menitis ke dalam tiub pengempar 50 ml. Proses seterusnya ialah sebanyak 3 ml DMEM 1% diambil dan dimasukkan ke dalam tiub pengempar 15 ml yang tadi lalu digoncangkan supaya sel-sel yang melekat pada tiub tertanggal. Kemudian, media tersebut diambil dan dititiskan ke atas penyaring sel. Seterusnya, sebanyak 2 ml DMEM 1% dititiskan pada penyaring sel secara perlahan supaya tiada sel yang melekat pada penyaring sel tersebut (Sehingga jumlah DMEM 1% menjadi 10 ml). Kemudian, kelalang kultur T 25 cm² dilabel dengan nama dan tarikh. Penutup kelalang kultur T 25 cm² tersebut dilonggarkan serta 5 ml DMEM 1% diambil dari tiub pengempar 50 ml dan dimasukkan ke dalam kelalang kultur T 25 cm² secara perlahan-lahan. Seterusnya, 1 titis DMEM 1% dititiskan pada piring penimbang untuk dilakukan proses pengiraan sel. Lampu dipastikan tutup dan bilik berada dalam keadaan gelap untuk proses penambahan IL-3, IL-6 dan SCF dengan menggunakan mikropipet. Isipadu bagi sitokin adalah seperti berikut: (1) IL-3: 5 µl bagi setiap 10 ml media, (2) IL-6: 10 µl bagi setiap 10 ml media, (3) SCF: 100 µl bagi setiap 10 ml media. Yang terakhir, sum-sum tulang yang dikulturkan dalam kelalang kultur T 25 cm² diletakkan di dalam inkubator dengan suhu 37 °C dan CO² 5% selama 24 jam sebelum digunakan dalam eksperimen.

Seterusnya, tatacara pengiraan sel dimulakan dengan satu titis DMEM 1% dititiskan pada piring penimbang dengan anggaran 20 µl. Kedua, larutan tripan biru 20 µl ditambahkan ke atas piring penimbang yang sama. Sebanyak 20 µl campuran larutan tersebut diambil dan diletakkan pada hemositometer untuk mengira sel yang berhidup. Sel yang hidup akan kelihatan bersinar manakala sel yang mati akan kelihatan berwarna biru. Jumlah sel yang hidup dikira pada empat petak yang besar pada hemositometer. Formula untuk pengiraan sel ditunjukkan di bawah.

$$[\text{Jumlah sel}] = \frac{A + B + C + D}{4} \times 10^4 \times 2$$

A, B, C, D mewakili kawasan petak besar pada hemositometer.

3.2.2 Penyediaan bahan kimia untuk isolasi sum-sum tulang dan asai UPK

a) Medium lengkap *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM)

Medium disterilkan dengan melakukan penapisan melalui pam Milipore® 0.2 µm dan kemudiannya ditambah dengan pen-strep 1%. Serum fetus bovin (FBS) 10% ditambahkan dan medium disimpan pada suhu 4 °C seketika sebelum menggunakan medium ini. Kemudian, sebanyak 30 ml medium ini diasingkan dan ditambahkan dengan pen-strep sehingga menjadi 2% untuk digunakan dalam teknik pemancuran sum-sum tulang mencit.

b) Agar metilselulosa

Agar metilselulosa dinyah sejuk bekukan daripada suhu -20 °C kepada suhu 4 °C sehari sebelum asai UPK dijalankan. Agar tersebut didedahkan kepada suhu bilik untuk mencairkannya selama 30 min sebelum penggunaannya. Seketika sebelum menggunakannya, ia divortekskan dan dibiarkan dalam keadaan menegak selama 15 min untuk menyingkirkan gelombong udara.

c) Salin penimbal berfosfat (PBS), pH 7.2-7.4

Penyediaan dimulakan dengan melarutkan tablet PBS dalam air suling 180 ml. Seterusnya, NaOH 1 M atau HCl 1 M digunakan untuk menyelaraskan pH larutan terhasil tersebut supaya berada di dalam julat antara 7.2-7.4. Seterusnya, isipadu larutan tersebut dijadikan kepada 200 ml diikuti pensterilan pada 121 °C selama 15 min. Selepas larutan ini mencapai suhu bilik, ia disimpan pada suhu 4 °C.

3.3 KAEDAH UJIAN

3.3.1 Penyediaan asai unit pembentuk koloni

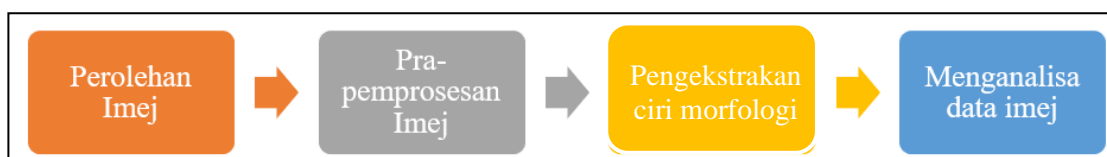
Penyediaan asai UPK dimulakan dengan mengemparkan kultur sel stem tersebut pada 2500 rpm selama 7 min dan kemudian disuspensikan semula dalam larutan DMEM 3ml yang baru. Seterusnya, suspensi sel 150 µl yang berkepekatan 2×10^5 sel/ml disediakan di dalam tiub pengempar mikro 1.5 ml yang steril. Kemudian, sebanyak 100 µl suspensi sel tersebut dimasukkan ke dalam tiub pengempar mikro 1.5 ml yang mengandungi 1

ml media metilselulosa. Tiub tersebut seterusnya divorteks selama 4 saat dan ditegakkan selama 15 min. Langkah kemudian ialah tip yang berhujung tumpul digunakan untuk memindahkan sebanyak 1 ml daripada larutan tersebut ke atas enam telaga. Seterusnya, menggunakan pipet serologi untuk mengisi plat telaga yang kosong dengan PBS 3 ml bagi setiap satu telaga untuk mengekalkan kelembapan plat tersebut. Akhir sekali, plat enam telaga dieramkan selama 7-14 hari di dalam inkubator dengan suhu 37 °C dan mengandungi 5% karbon dioksida.

3.4 ANALISIS BIO-PENGIMEJAN

Apabila SSH telah dikultur dan dieram selama 14 hari, pertumbuhan SSH perlu diperhatikan dengan menggunakan mikroskop. Untuk mendapat imej yang berkualiti dan terbaik untuk dianalisa, beberapa kaedah perlu dilakukan terhadap imej mentah. Setiap kaedah ini menggunakan algoritma tertentu dan imej mentah akan diproses secara pemprosesan digital. Perisian MATLAB versi 2021 telah digunakan untuk mendapatkan keputusan bagi kajian ini.

Kajian ini terbahagi kepada empat fasa utama seperti yang digambarkan di Rajah 3.1. Fasa pertama dalam penganalisaan adalah pengumpulan data. Data yang dikumpulkan adalah dalam bentuk imej digital melalui perolehan imej. Imej digital perlu melalui fasa pra-pemprosesan untuk mendapat imej digital yang lebih jelas iaitu hanya memfokuskan kepada kawasan yang ingin dikenali. Seterusnya, pengekstrakan ciri akan dilakukan terhadap imej digital dengan menggunakan algoritma kaedah *regionprops* dalam perisian MATLAB. Pemilihan ciri yang terbaik untuk membezakan ketiga-tiga UPK hematopoietik bagi keturunan mieloid (UPK-GM, UPK-G, UPK-M) dilakukan dengan menggunakan perisian SPSS versi 25.



Rajah 3.1 Carta alir kerja

3.4.1 Pengumpulan data

Imej UPK keturunan mieloid diperoleh dengan menggunakan telefon pintar Samsung Galaxy J7 2016, penyesuai telefon pintar SOLOMARK, dan mikroskop songsang Olympus Model NKX41. Telefon pintar ini dilengkapi dengan kamera 12 megapiksel. Gambar 3.1 menunjukkan foto penyesuai telefon pintar SOLOMAR. Gambar 3.2 menunjukkan mikroskop songsang yang dipasang dengan telefon pintar yang bersambung dengan penyesuai telefon pintar.



Gambar 3.1 Foto penyesuai telefon pintar SOLOMAR



Gambar 3.2 Mikroskop songsang yang dipasang dengan telefon pintar yang bersambung dengan penyesuai telefon pintar

Langkah-langkah pengambilan imej dimulakan dengan memasang penyesuai telefon pintar SOLOMARK pada telefon pintar Samsung Galaxy J7 2016. Kedua, lubang penyesuai diselaraskan dengan baik agar ia berpadanan dengan lensa kamera untuk mengurangkan pembentukan bayang. Ketiga, aplikasi kamera pada telefon pintar dibuka dan bulatan cerah dipastikan berada di tengah-tengah skrin kamera. Keempat, telefon pintar yang sudah dilekat dengan penyesuai telefon pintar dipasang ke dalam tiub mikroskop seperti yang ditunjukkan dalam Gambar 3.2. Kelima, pengambilan imej dilakukan. Jadual 3.1 menunjukkan jumlah imej UPK progenitor berketurunan mieloid yang diambil selepas proses pelabelan dilakukan.

Jadual 3.1 Bilangan imej UPK progenitor berketurunan mieloid yang diambil

Jenis UPK bagi keturunan mieloid	GM	G	M
Bilangan imej	208	116	44

Setiap imej bagi tiga jenis UPK tersebut diambil pada pembesaran $\times 4$, $\times 10$, $\times 20$ dan $\times 40$. Format bagi imej diambil adalah JPEG dan saiz imej adalah antara 1500-4000 kb. Setiap imej UPK progenitor berketurunan mieloid yang diambil mempunyai nilai piksel sebanyak 3096×4128 piksel. Jadual 3.2 di bawah menunjukkan ciri-ciri pengambilan imej UPK progenitor berketurunan mieloid.

Jadual 3.2 Ciri-ciri pengambilan imej unit pembentuk koloni

Pengambilan imej	Ciri-ciri
Telefon pintar	Samsung Galaxy J7 2016
Mikroskop	Mikroskop songsang Olympus Model NKX41
Pembesaran mikroskop yang digunakan	$\times 4$, $\times 10$, $\times 20$ dan $\times 40$
Format	JPEG
Warna	24-bits warna RGB
Resolusi	3096×4128

3.4.2 Pelabelan imej

Pelabelan jenis UPK progenitor mieloid dalam imej dijalankan secara manual. Kesemua imej dilabel dengan berpanduan rujukan berdasarkan atlas daripada syarikat STEMCELL Technologies. Selain itu, imej yang sudah dilabel juga disahkan oleh pakar dalam bidang SSH dan perubatan molekul, Professor Madya Dr. Zariyantey Abdul Hamid dari Fakulti Sains Kesihatan, Universiti Kebangsaan Malaysia.

3.4.3 Penyaringan imej

Sebelum pra-pemprosesan imej dilakukan, imej yang berkualiti rendah seperti imej yang mempunyai bayangan, imej yang kabur, imej yang tidak mempunyai struktur koloni yang jelas dan imej yang mempunyai latar belakang tidak berwarna konsisten disaringkan terlebih dahulu. Proses penyaringan ini dibantu dan disahkan oleh pakar dalam bidang SSH dan perubatan molekul, Professor Madya Dr. Zariyantey Abdul Hamid dari Fakulti Sains Kesihatan, Universiti Kebangsaan Malaysia. Seterusnya, imej yang optimum digunakan dalam pra-pemprosesan imej.

3.4.4 Pra-pemprosesan imej

Di fasa ini, imej digital yang diambil akan diproses agar kawasan imej yang diperlukan dapat difokuskan dengan lebih jelas. Semua proses pra-pemprosesan adalah dilakukan secara automatik iaitu melalui algoritma yang telah dibina. Terdapat tiga proses yang dilakukan sebelum imej dianalisa iaitu proses penukaran imej RGB kepada imej skala kelabu, segmentasi dan penukaran daripada imej skala kelabu kepada imej binari. Proses pertama adalah penukaran imej daripada imej RGB kepada imej skala kelabu dilakukan melalui kod dalam algoritma iaitu $X1gray=rgb2gray(result)$. Kedua, segmentasi imej dilakukan melalui kaedah *otsu thresholding*. Ketiga, penukaran daripada imej skala kelabu kepada imej binari dilakukan supaya pemisahan objek dari latar belakang dapat dipermudahkan, kawasan berminat difokuskan dengan lebih jelas dan membuang latar belakang imej yang tidak mahu dianalisa. Setiap piksel dilabel sebagai 'latar belakang' atau 'objek' serta warna hitam dan putih yang sesuai diberikan melalui proses segmentasi.

3.4.5 Pengekstrakan dan pemilihan ciri

Dalam bahagian ini, sebanyak sebelas ciri-ciri morfologi diekstrak untuk menganalisa ciri signifikan yang dapat membezakan antara UPK progenitor berketurunan mieloid. Antara sebelas ciri-ciri morfologi yang diekstrak termasuk kawasan (*area*), sentroid (x-koordinat) (*centroid (x-coordinate)*), sentroid (y-koordinat) (*centroid (y-coordinate)*), kepanjangan major axis (*major axis length*), kepanjangan minor axis (*minor axis length*), orientasi (*orientation*), eksentrik (*eccentricity*), kekukuhan (*solidity*), perimeter (*perimeter*), keluasan (*extent*) dan diameter setara (*equivalent diameter*). Data ciri-ciri morfologi tersebut diekstrak melalui kaedah *regionprops* dalam perisian MATLAB versi 2021.

Tatacara untuk mengendalikan perisian MATLAB dalam penganalisan ciri morfologi imej pertama bermula dengan perisian MATLAB dan fail algoritma yang dibina hendaklah dibuka. Kedua, sebelum menganalisa, imej yang ingin digunakan dipastikan adalah betul dan tepat serta imej tersebut diletakkan dalam folder bersama dengan fail algoritma. Ketiga, simbol 'EDITOR' perlu diklik kemudian diteruskan dengan menekan simbol 'RUN'. Keempat, selepas perisian selesai menganalisa, folder

penyimpanan yang meletakkan imej dan fail algoritma sebelum ini dicari. Folder tersebut mengandungi hasil penganalisa iaitu gambar dan fail excel yang berlabel 'result_nama imej'. Contohnya, 'result_OE CFU-GM D14 4 ×20'. Selepas analisis, satu imej binari dan satu fail excel yang merekodkan data ciri-ciri morfologi dihasilkan daripada satu imej mentah UPK. Fail excel digunakan agar menyimpan data menjadi lebih teratur dan kemas. Keenam, kesemua imej tersebut perlu diekstrak sekali lagi dalam bentuk nombor supaya ia boleh dianalisa di dalam perisian SPSS untuk mengenalpasti ciri morfologi yang signifikan dan optimum bagi pembezaan antara jenis UPK progenitor berketurunan mieloid (UPK-GM, UPK-G dan UPK-M).

3.5 ANALISA STATISTIK

Ujian yang digunakan dalam SPSS adalah *One Way ANOVA* dan *Independent T-test* jika ujian normaliti menunjukkan keputusan yang normal. Namun, ujian *Kruskal-Wallis* dan *Mann Whitney U* digunakan jika ujian normaliti menunjukkan keputusan yang tidak normal. *One Way ANOVA* dan *Kruskal-Wallis* digunakan untuk mengenalpasti ciri-ciri morfologi UPK progenitor mieloid manakala *Independent T-test* dan *Mann Whitney U test* digunakan untuk mengenalpasti ciri-ciri morfologi yang optimum bagi pembezaan antara jenis UPK progenitor mieloid (UPK-GM, UPK-G dan UPK-M).

BAB IV

HASIL KAJIAN

4.1 PENETAPAN YANG OPTIMUM BAGI PEROLEHAN IMEJ UNIT PEMBENTUK KOLONI


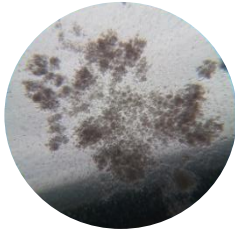
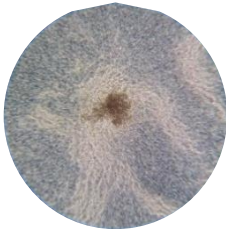
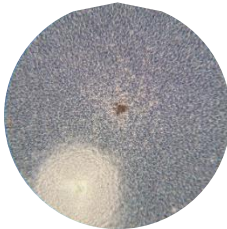
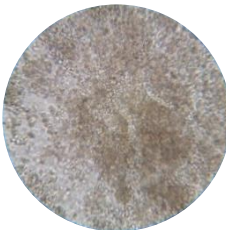
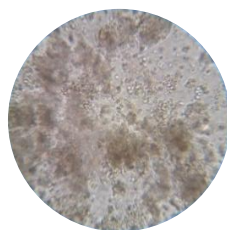
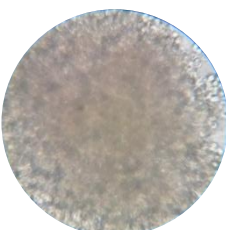
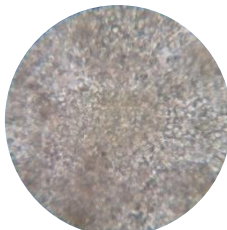
Sebelum analisa dilakukan, imej yang mempunyai ciri kerosakan disaring terlebih dahulu supaya tidak digunakan sebagai data. Hal ini disebabkan imej yang mempunyai ciri rosak akan menghasilkan keputusan yang ralat bagi proses pengekstrakan ciri morfologi koloni sel stem. Penyaringan imej yang berkualiti rendah adalah dijalankan secara manual. Gambar 4.1 telah menunjukkan contoh ciri imej yang dikecualikan dari analisa imej. Gambar 4.1 menunjukkan contoh ciri imej berkualiti rendah, ia termasuk imej beserta bayang-bayang, imej koloni yang berkabur, imej yang mempunyai warna latar belakang tidak konsisten, imej tidak mempunyai struktur koloni yang jelas, dan imej koloni yang kurang jelas. Imej-imej tersebut tidak digunakan di dalam analisa MATLAB.



Gambar 4.1 Contoh ciri imej yang dikecualikan dari analisa imej.

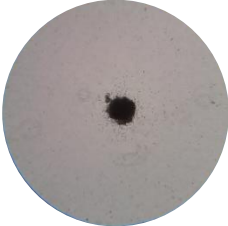
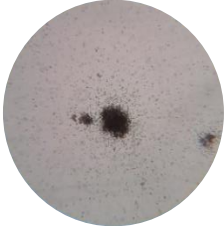
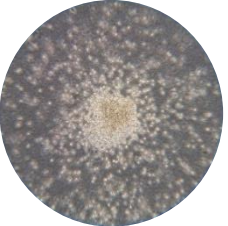
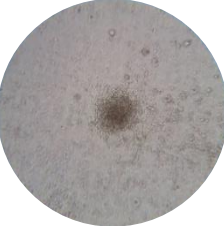
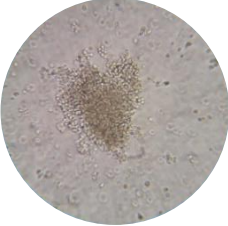
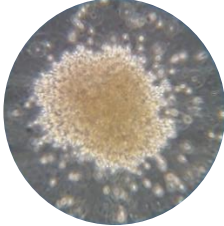
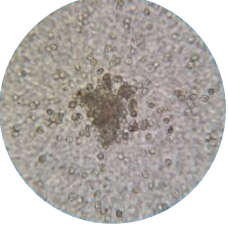
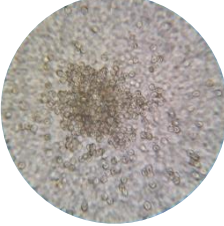
Jadual 4.1 menunjukkan contoh imej berkualiti rendah yang dikecualikan pada pembesaran yang berbeza termasuk $\times 4$, $\times 10$, $\times 20$, dan $\times 40$. Jadual 4.1 menunjukkan contoh imej berkualiti rendah yang mempunyai bayangan, imej koloni yang kabur, imej yang mempunyai warna latar belakang yang tidak konsisten, atau imej yang tidak mempunyai struktur koloni yang jelas. Imej yang tinggal seterusnya digunakan dalam analisis dengan menggunakan perisian MATLAB versi 2021.

Jadual 4.1 Contoh imej berkualiti rendah yang dikecualikan pada pembesaran yang berbeza ($\times 4$, $\times 10$, $\times 20$, $\times 40$)

Pembesaran	Imej berkualiti rendah	
Pembesaran $\times 4$		
	Imej yang mempunyai bayangan	
		
Pembesaran $\times 10$	Imej yang mempunyai warna latar belakang yang tidak konsisten	
		
	Imej yang tidak mempunyai struktur koloni yang jelas	
Pembesaran $\times 20$		
	Imej yang berkabut dan tidak jelas	
Pembesaran $\times 40$		

Jadual 4.2 menunjukkan imej UPK yang berkualiti baik dan mencapai penetapan optimum pada pembesaran yang berbeza iaitu $\times 4$, $\times 10$, $\times 20$ dan $\times 40$. Jadual 4.2 menunjukkan imej-imej yang mencapai penetapan optimum iaitu tidak ada bayangan, imej tidak kabur, mempunyai struktur koloni yang jelas dan mempunyai warna latar belakang yang konsisten. Selepas pengecualian imej berkualiti rendah, jumlah imej yang dianalisa adalah kurang daripada jumlah asal imej yang telah dikumpulkan.

Jadual 4.2 Imej optimum bagi perolehan imej unit pembentuk koloni

Pembesaran	Imej optimum	
Pembesaran $\times 4$		
Pembesaran $\times 10$		
Pembesaran $\times 20$		
Pembesaran $\times 40$		

Jadual 4.3 menunjukkan bilangan imej sebelum dan selepas proses penyaringan dilakukan, antaranya pembesaran $\times 10$ mempunyai bilangan imej akhir yang paling

banyak iaitu sebanyak 72 imej manakala pembesaran $\times 40$ mempunyai bilangan imej akhir yang paling sedikit iaitu hanya 27 imej. Jumlah imej dikurangkan daripada sejumlah 368 imej kepada 210 imej selepas proses penyaringan.

Jadual 4.3 Bilangan imej unit pembentuk koloni sebelum dan selepas proses penyaringan dilakukan

Pembesaran	Unit pembentuk koloni (UPK)	Bilangan imej selepas perolehan imej dilakukan	Bilangan imej yang tidak menepati syarat untuk dianalisa	Bilangan akhir imej yang dianalisa dalam SPSS	Peratus imej akhir yang dianalisa dalam SPSS (%)
$\times 4$	UPK-G	29	11	18	62
	UPK-GM	52	24	28	54
	UPK-M	11	3	8	73
	Jumlah	92	38	54	59
$\times 10$	UPK-G	29	2	27	93
	UPK-GM	52	15	37	71
	UPK-M	11	3	8	73
	Jumlah	92	20	72	78
$\times 20$	UPK-G	29	13	16	55
	UPK-GM	52	22	30	58
	UPK-M	11	0	11	100
	Jumlah	92	35	57	62
$\times 40$	UPK-G	29	21	8	28
	UPK-GM	52	42	10	19
	UPK-M	11	2	9	82
	Jumlah	92	65	27	29

4.2 PENGENALPASTI CIRI MORFOLOGI UNIT PEMBENTUK KOLONI PROGENITOR BERKETURUNAN MIELOID

Pada kesemua data ciri morfologi yang diperoleh telah diekstrak ke dalam perisian SPSS untuk mengenalpasti ciri-ciri morfologi UPK progenitor berketurunan mieloid. Imej UPK progenitor mieloid boleh dibahagi kepada empat pembesaran iaitu $\times 4$, $\times 10$, $\times 20$ dan $\times 40$. Setiap pembesaran mempunyai tiga faktor bebas (*independent factor*) dan sebelas faktor bergantung (*dependent factor*). Faktor bebas ialah UPK, termasuk UPK-GM, UPK-G dan UPK-M manakala faktor bergantung ialah ciri morfologi, termasuk kawasan, sentroid (x-koordinat), sentroid (y-koordinat), diameter setara, kepanjangan major axis, kepanjangan minor axis, orientasi, perimeter, eksentrik, kekukuhan dan keluasan.

Jadual 4.4 menunjukkan keputusan pengenalpastian ciri-ciri morfologi UPK progenitor berketurunan mieloid iaitu UPK-GM, UPK-G dan UPK-M pada pembesaran $\times 4$. Jadual 4.4 menunjukkan tiga ciri morfologi yang signifikan ($p < 0.05$) iaitu sentroid (x-koordinat), sentroid (y-koordinat) dan eksentrik pada pembesaran $\times 4$. Manakala lapan ciri morfologi menunjukkan keputusan yang tidak signifikan ($p > 0.05$) bagi UPK progenitor mieloid pada pembesaran $\times 4$. Ciri-ciri morfologi yang tidak signifikan termasuk kawasan, kepanjangan major axis panjang, kepanjangan minor axis, orientasi, diameter setara, kekukuhan, keluasan dan perimeter. Keputusan mengenalpasti ciri eksentrik, sentroid (x-koordinat) dan sentroid (y-koordinat) sebagai ciri morfologi UPK progenitor berketurunan mieloid iaitu UPK-GM, UPK-G dan UPK-M pada pembesaran $\times 4$.

Jadual 4.4 Keputusan pengenalpastian ciri-ciri morfologi UPK progenitor berketurunan mieloid pada pembesaran $\times 4$

	Ciri morfologi	Nilai p
Signifikan ($p < 0.05$)	Eksentrik	.002
	Sentroid (x-koordinat)	.008
	Sentroid (y-koordinat)	.032
Tidak signifikan ($p > 0.05$)	Diameter setara	.094
	Kepanjangan major axis	.056
	Kepanjangan minor axis	.131
	Kawasan	.094
	Perimeter	.380
	Orientasi	.296
	Kekukuhan	.616
	Keluasan	.098

Jadual 4.5 menunjukkan keputusan pengenalpastian ciri-ciri morfologi UPK progenitor berketurunan mieloid iaitu UPK-GM, UPK-G dan UPK-M pada pembesaran $\times 10$. Jadual 4.5 menunjukkan empat ciri morfologi yang sangat signifikan ($p < 0.01$) iaitu kawasan, kepanjangan minor axis, diameter setara dan perimeter bagi UPK progenitor mieloid pada pembesaran $\times 10$. Sebanyak tiga ciri morfologi yang menunjukkan keputusan signifikan ($p < 0.05$) iaitu eksentrik, kepanjangan major axis dan orientasi. Manakala empat ciri morfologi menunjukkan keputusan yang tidak signifikan ($p > 0.05$) termasuk sentroid (x-koordinat), sentroid (y-koordinat), kekukuhan dan keluasan. Keputusan mengenalpasti kawasan, kepanjangan minor axis, diameter setara, perimeter,

eksentrik, kepanjangan major axis dan orientasi sebagai ciri morfologi UPK progenitor berketurunan mieloid iaitu UPK-GM, UPK-G dan UPK-M pada pembesaran $\times 10$.

Jadual 4.5 Keputusan pengenalpastian ciri-ciri morfologi UPK progenitor berketurunan mieloid pada pembesaran $\times 10$

	Ciri morfologi	Nilai p
Sangat signifikan ($p < 0.01$)	Kawasan	.000
	Kepanjangan minor axis	.000
	Diameter setara	.000
	Perimeter	.000
Signifikan ($p < 0.05$)	Eksentrik	.001
	Kepanjangan major axis	.002
	Orientasi	.018
Tidak signifikan ($p > 0.05$)	Sentroid (x-koordinat)	.509
	Sentroid (y-koordinat)	.476
	Kekukuhan	.528
	Keluasan	.434

Jadual 4.6 menunjukkan keputusan pengenalpastian ciri-ciri morfologi UPK progenitor berketurunan mieloid iaitu UPK-GM, UPK-G dan UPK-M pada pembesaran $\times 20$. Jadual 4.6 menunjukkan bahawa satu ciri morfologi yang sangat signifikan ($p < 0.01$) iaitu kekukuhan. Sebanyak tujuh ciri morfologi yang menunjukkan keputusan signifikan ($p < 0.05$) iaitu kawasan, kepanjangan major axis, kepanjangan minor axis, eksentrik, diameter setara, keluasan dan perimeter. Manakala tiga ciri morfologi menunjukkan keputusan yang tidak signifikan ($p > 0.05$) termasuk sentroid (x-koordinat), sentroid (y-koordinat) dan orientasi. Keputusan mengenalpasti kekukuhan, kawasan, kepanjangan major axis, kepanjangan minor axis, eksentrik, diameter setara, keluasan dan perimeter sebagai ciri morfologi UPK progenitor berketurunan mieloid iaitu UPK-GM, UPK-G dan UPK-M pada pembesaran $\times 20$.

Jadual 4.6 Keputusan pengenalpastian ciri-ciri morfologi UPK progenitor berketurunan mieloid pada pembesaran $\times 20$

	Ciri morfologi	Nilai p
Sangat signifikan ($p < 0.01$)	Kekukuhan	.000
Signifikan ($p < 0.05$)	Kawasan	.004
	Kepanjangan major axis	.005
	Kepanjangan minor axis	.010
	Eksentrik	.009
	Diameter setara	.004

bersambung...

sambungan...		
	Keluasan	.001
	Perimeter	.006
Tidak signifikan ($p>0.05$)	Sentroid (x-koordinat)	.595
	Sentroid (y-koordinat)	.292
	Orientasi	.708

Jadual 4.7 menunjukkan keputusan pengenalpastian ciri-ciri morfologi bagi UPK progenitor berketurunan mieloid iaitu UPK-GM, UPK-G dan UPK-M pada pembesaran $\times 40$. Jadual 4.7 menunjukkan semua ciri morfologi adalah tidak signifikan ($p>0.05$) termasuk ciri sentroid (x-koordinat), sentroid (y-koordinat), kawasan, kepanjangan minor axis, kepanjangan major axis, eksentrik, diameter setara, keluasan, kekukuhan, orientasi dan perimeter. Keputusan tidak mengenalpasti sebarang ciri morfologi UPK progenitor mieloid (UPK-GM, UPK-G dan UPK-M) pada pembesaran $\times 40$.

Jadual 4.7 Keputusan pengenalpastian ciri-ciri morfologi UPK progenitor berketurunan mieloid pada pembesaran $\times 40$

	Ciri morfologi	Nilai p
Tidak signifikan ($p>0.05$)	Kawasan	.412
	Sentroid (x-koordinat)	.480
	Sentroid (y-koordinat)	.751
	Kepanjangan major axis	.998
	Kepanjangan minor axis	.255
	Eksentrik	.283
	Orientasi	.148
	Diameter setara	.412
	Kekukuhan	.354
	Keluasan	.340
	Perimeter	.900

Jadual 4.8 menunjukkan ringkasan keputusan pengenalpastian ciri-ciri morfologi UPK progenitor berketurunan mieloid iaitu UPK-GM, UPK-G dan UPK-M pada pembesaran $\times 4$, $\times 10$, $\times 20$ dan $\times 40$. Jadual 4.8 menunjukkan eksentrik merupakan ciri morfologi UPK progenitor mieloid (UPK-GM, UPK-G dan UPK-M) yang paling relevan kerana ciri morfologi ini merupakan ciri yang dikenalpasti pada kebanyakan pembesaran iaitu $\times 4$, $\times 10$ dan $\times 20$. Tiada ciri morfologi dikenalpasti pada pembesaran $\times 40$. Ciri-ciri morfologi yang disenaraikan dalam Jadual 4.8 seterusnya digunakan

untuk menentukan ciri morfologi yang optimum dalam membezakan jenis UPK progenitor berketurunan mieloid.

Jadual 4.8 Ringkasan keputusan pengenaltastian ciri-ciri morfologi UPK progenitor berketurunan mieloid pada pembesaran $\times 4$, $\times 10$, $\times 20$, dan $\times 40$

Pembesaran	Ciri morfologi signifikan
$\times 4$	Sentroid (x-koordinat) , sentroid(y-koordinat), eksentrik
$\times 10$	Kawasan, kepanjangan minor axis, kepanjangan major axis, diameter setara, perimeter, eksentrik, orientasi
$\times 20$	Kekukuhan, kawasan, kepanjangan major axis, kepanjangan minor axis, eksentrik, diameter setara, keluasan, perimeter
$\times 40$	-

4.3 PENENTUAN CIRI MORFOLOGI OPTIMUM YANG MEMBEZAKAN JENIS UNIT PEMBENTUK KOLONI PROGENITOR BERKETURUNAN MIELOID

4.3.1 Ciri morfologi optimum yang membezakan jenis UPK progenitor mieloid pada pembesaran $\times 4$

Tiga ciri morfologi UPK progenitor mieloid telah dikenalpasti pada pembesaran $\times 4$. Antara tiga ciri morfologi tersebut termasuk sentroid (x-koordinat), sentroid (y-koordinat) dan eksentrik. Ciri-ciri morfologi tersebut seterusnya dianalisis untuk membezakan jenis UPK progenitor berketurunan mieloid. Jadual 4.9 menunjukkan keputusan ciri morfologi optimum yang membezakan antara UPK-G dengan UPK-GM pada pembesaran $\times 4$. Jadual 4.9 menunjukkan sentroid (x-koordinat) dan eksentrik adalah ciri morfologi signifikan ($p < 0.05$) bagi pembezaan antara UPK-G dengan UPK-GM manakala sentroid (y-koordinat) adalah ciri morfologi tidak signifikan ($p > 0.05$) bagi pembezaan antara UPK-G dengan UPK-GM. Secara ringkas, sentroid (x-koordinat) dan eksentrik merupakan ciri-ciri morfologi optimum bagi pembezaan antara UPK-G dengan UPK-GM pada pembesaran $\times 4$.

Jadual 4.9 Keputusan ciri morfologi optimum yang membezakan antara UPK-G dengan UPK-GM pada pembesaran $\times 4$

	Ciri morfologi	Nilai p
Signifikan ($p < 0.05$)	Sentroid (x-koordinat)	.020
	Eksentrik	.022
Tidak signifikan ($p > 0.05$)	Sentroid (y-koordinat)	.280

Jadual 4.10 menunjukkan keputusan ciri-ciri morfologi optimum yang membezakan antara UPK-G dengan UPK-M pada pembesaran $\times 4$. Jadual 4.10

menunjukkan hasil yang sama dengan pembezaan antara UPK-G dengan UPK-GM dalam Jadual 4.9, iaitu sentroid (x-koordinat) dan eksentrik yang signifikan ($p < 0.05$) bagi pembezaan antara UPK-G dengan UPK-M manakala sentroid (y-koordinat) tidak signifikan ($p < 0.05$) bagi pembezaan antara UPK-G dengan UPK-M. Secara ringkas, sentroid (x-koordinat) dan eksentrik merupakan ciri-ciri morfologi optimum bagi pembezaan antara UPK-G dengan UPK-M pada pembesaran $\times 4$.

Jadual 4.10 Keputusan ciri morfologi optimum yang membezakan antara UPK-G dengan UPK-M pada pembesaran $\times 4$

	Ciri morfologi	Nilai p
Signifikan ($p < 0.05$)	Sentroid (x-koordinat)	.005
	Eksentrik	.001
Tidak signifikan ($p > 0.05$)	Sentroid (y-koordinat)	.243

Jadual 4.11 menunjukkan keputusan ciri-ciri morfologi optimum yang membezakan antara UPK-GM dengan UPK-M pada pembesaran $\times 4$. Jadual 4.11 menunjukkan sentroid (y-koordinat) dan eksentrik adalah ciri-ciri morfologi signifikan ($p < 0.05$) bagi pembezaan antara UPK-GM dengan UPK-M manakala ciri sentroid (x-koordinat) adalah tidak signifikan ($p > 0.05$) bagi pembezaan antara UPK-GM dengan UPK-M. Secara ringkas, sentroid (y-koordinat) dan eksentrik merupakan ciri-ciri morfologi optimum bagi pembezaan antara UPK-GM dengan UPK-M pada pembesaran $\times 4$.

Jadual 4.11 Keputusan ciri morfologi optimum yang membezakan antara UPK-GM dengan UPK-M pada pembesaran $\times 4$

	Ciri morfologi	Nilai p
Signifikan ($p < 0.05$)	Sentroid (y-koordinat)	.005
	Eksentrik	.025
Tidak signifikan ($p > 0.05$)	Sentroid (x-koordinat)	.196

Jadual 4.12 menunjukkan ringkasan ciri-ciri morfologi optimum bagi pembezaan antara jenis UPK progenitor mieloid (UPK-GM, UPK-G, UPK-M) pada pembesaran $\times 4$. Jadual 4.12 menunjukkan eksentrik adalah ciri morfologi yang optimum bagi membezakan jenis UPK progenitor mieloid (UPK-GM, UPK-G, UPK-M) pada pembesaran $\times 4$.

Jadual 4.12 Ringkasan ciri-ciri morfologi optimum bagi pembezaan antara jenis UPK progenitor mieloid pada pembesaran $\times 4$

Pembezaan UPK	Ciri morfologi optimum
Antara UPK-G dengan UPK-GM	Sentroid (x-koordinat), eksentrik
Antara UPK-G dengan UPK-M	Sentroid (x-koordinat), eksentrik
Antara UPK-GM dengan UPK-M	Sentroid (y-koordinat), eksentrik

4.3.2 Ciri morfologi optimum yang membezakan jenis UPK progenitor mieloid pada pembesaran $\times 10$

Tujuh ciri morfologi telah dikenalpasti untuk UPK progenitor mieloid (UPK-G, UPK-GM, UPK-M) pada pembesaran $\times 10$ iaitu kawasan, kepanjangan minor axis, diameter setara, perimeter, eksentrik, kepanjangan major axis, dan orientasi. Jadual 4.13 menunjukkan keputusan ciri morfologi optimum yang membezakan antara UPK-G dengan UPK-GM pada pembesaran $\times 10$. Jadual 4.13 menunjukkan ciri morfologi seperti kawasan, kepanjangan major axis, dan diameter setara mempunyai keputusan yang signifikan ($p < 0.05$) bagi pembezaan antara UPK-G dengan UPK-GM manakala kepanjangan minor axis, eksentrik, orientasi dan perimeter mempunyai keputusan yang tidak signifikan ($p > 0.05$) bagi pembezaan antara UPK-G dengan UPK-GM pada pembesaran $\times 10$. Secara ringkas, kawasan, kepanjangan major axis, dan diameter setara merupakan ciri-ciri morfologi optimum bagi pembezaan antara UPK-G dengan UPK-GM pada pembesaran $\times 10$.

Jadual 4.13 Keputusan ciri morfologi optimum yang membezakan antara UPK-G dengan UPK-GM pada pembesaran $\times 10$

	Ciri morfologi	Nilai p
Signifikan ($p < 0.05$)	Kawasan	.019
	Kepanjangan major axis	.029
	Diameter setara	.019
Tidak signifikan ($p > 0.05$)	Kepanjangan minor axis	.054
	Eksentrik	.211
	Orientasi	.073
	Perimeter	.057

Jadual 4.14 menunjukkan keputusan ciri morfologi optimum yang membezakan antara UPK-G dengan UPK-M pada pembesaran $\times 10$. Jadual 4.14 menunjukkan ciri morfologi seperti kawasan, kepanjangan major axis, kepanjangan minor axis, diameter setara, dan perimeter adalah sangat signifikan ($p < 0.01$) bagi pembezaan antara UPK-G dengan UPK-M. Eksentrik adalah signifikan ($p < 0.05$) bagi pembezaan antara UPK-G

dengan UPK-M manakala orientasi adalah tidak signifikan ($p > 0.05$) bagi pembezaan antara UPK-G dengan UPK-M. Secara ringkas, kawasan, kepanjangan major axis, kepanjangan minor axis, diameter setara, perimeter dan eksentrik merupakan ciri-ciri morfologi optimum bagi pembezaan antara UPK-G dengan UPK-M pada pembesaran $\times 10$.

Jadual 4.14 Keputusan ciri morfologi optimum yang membezakan antara UPK-G dengan UPK-M pada pembesaran $\times 10$

	Ciri morfologi	Nilai p
Sangat signifikan ($p < 0.01$)	Kawasan	.000
	Kepanjangan major axis	.000
	Kepanjangan minor axis	.000
	Diameter setara	.000
	Perimeter	.000
Signifikan ($p < 0.05$)	Eksentrik	.003
Tidak signifikan ($p > 0.05$)	Orientasi	.223

Jadual 4.15 menunjukkan keputusan ciri-ciri morfologi optimum yang membezakan antara UPK-GM dengan UPK-M pada pembesaran $\times 10$. Jadual 4.15 menunjukkan eksentrik merupakan ciri morfologi yang sangat signifikan ($p < 0.01$) bagi pembezaan antara UPK-GM dengan UPK-M. Ciri-ciri morfologi seperti kawasan, kepanjangan minor axis, orientasi, diameter setara dan perimeter mempunyai keputusan yang signifikan ($p < 0.05$) bagi pembezaan antara UPK-GM dengan UPK-M manakala kepanjangan major axis menunjukkan keputusan yang tidak signifikan ($p > 0.05$) bagi pembezaan antara UPK-GM dengan UPK-M. Secara ringkas, eksentrik, kawasan, kepanjangan minor axis, orientasi, diameter setara dan perimeter merupakan ciri-ciri morfologi optimum bagi pembezaan antara UPK-GM dengan UPK-M pada pembesaran $\times 10$.

Jadual 4.15 Keputusan ciri morfologi optimum yang membezakan antara UPK-GM dengan UPK-M pada pembesaran $\times 10$

	Ciri morfologi	Nilai p
Sangat signifikan ($p < 0.01$)	Eksentrik	.000
Signifikan ($p < 0.05$)	Kawasan	.026
	Kepanjangan minor axis	.006
	Orientasi	.008
	Diameter setara	.026
	Perimeter	.005
Tidak signifikan ($p > 0.05$)	Kepanjangan major axis	.123

Jadual 4.16 menunjukkan ringkasan ciri-ciri morfologi optimum bagi pembezaan antara jenis UPK progenitor mieloid (UPK-GM, UPK-G dan UPK-M) pada pembesaran $\times 10$. Jadual 4.16 menunjukkan ciri kawasan dan diameter setara merupakan ciri-ciri morfologi yang optimum untuk membezakan jenis UPK progenitor mieloid (UPK-GM, UPK-G dan UPK-M) pada pembesaran $\times 10$.

Jadual 4.16 Ringkasan ciri-ciri morfologi optimum bagi pembezaan antara jenis UPK progenitor mieloid pada pembesaran $\times 10$

Pembezaan UPK	Ciri morfologi optimum
Antara UPK-G dengan UPK-GM	Kawasan, kepanjangan major axis, diameter setara
Antara UPK-G dengan UPK-M	Kawasan, kepanjangan major axis, kepanjangan minor axis, diameter setara, perimeter, eksentrik
Antara UPK-M dengan UPK-GM	Kawasan, kepanjangan minor axis, diameter setara, eksentrik, orientasi, perimeter

4.3.3 Ciri morfologi optimum yang membezakan jenis UPK progenitor mieloid pada pembesaran $\times 20$

Sebanyak lapan ciri morfologi UPK progenitor mieloid iaitu ciri kekukuhan, kawasan, kepanjangan major axis, kepanjangan minor axis, eksentrik, diameter setara, keluasan dan perimeter telah dikenalpasti. Ciri-ciri morfologi tersebut seterusnya dianalisis untuk membezakan jenis UPK progenitor berketurunan mieloid. Jadual 4.17 menunjukkan keputusan ciri-ciri morfologi optimum yang membezakan antara UPK-G dengan UPK-GM pada pembesaran $\times 20$. Jadual 4.17 telah menunjukkan kekukuhan merupakan ciri morfologi yang sangat signifikan ($p < 0.01$) dan keluasan merupakan ciri morfologi yang signifikan ($p < 0.05$) bagi pembezaan antara UPK-G dengan UPK-GM. Manakala, ciri morfologi seperti kawasan, kepanjangan major axis, kepanjangan minor axis, eksentrik, diameter setara dan perimeter adalah tidak signifikan ($p > 0.05$) bagi pembezaan antara UPK-G dengan UPK-GM. Secara ringkas, ciri kekukuhan dan keluasan merupakan ciri-ciri morfologi optimum bagi pembezaan antara UPK-G dengan UPK-GM pada pembesaran $\times 20$.

Jadual 4.17 Keputusan ciri morfologi optimum yang membezakan antara UPK-G dengan UPK-GM pada pembesaran $\times 20$

	Ciri morfologi	Nilai p
Sangat signifikan ($p < 0.01$)	Kekukuhan	.000

bersambung...

sambungan...		
Signifikan ($p < 0.05$)	Keluasan	.001
Tidak signifikan ($p > 0.05$)	Kawasan	.102
	Kepanjangan major axis	.205
	Kepanjangan minor axis	.393
	Eksentrik	.678
	Diameter setara	.102
	Perimeter	.661

Jadual 4.18 telah menunjukkan keputusan ciri-ciri morfologi optimum yang membezakan antara UPK-G dengan UPK-M pada pembesaran $\times 20$. Jadual 4.18 menunjukkan semua ciri morfologi adalah berupaya untuk membezakan antara UPK-G dengan UPK-M pada pembesaran $\times 20$. Antaranya lima ciri morfologi yang sangat signifikan ($p < 0.01$), ia termasuk kawasan, kepanjangan major axis, kepanjangan minor axis, diameter setara, dan perimeter. Eksentrik, kekukuhan dan keluasan adalah ciri morfologi signifikan ($p < 0.05$) bagi pembezaan antara UPK-G dengan UPK-M. Secara ringkas, kawasan, kepanjangan major axis, kepanjangan minor axis, diameter setara, perimeter, eksentrik, kekukuhan dan keluasan merupakan ciri-ciri morfologi optimum bagi pembezaan antara UPK-G dengan UPK-M pada pembesaran $\times 20$.

Jadual 4.18 Keputusan ciri morfologi optimum yang membezakan antara UPK-G dengan UPK-M pada pembesaran $\times 20$

	Ciri morfologi	Nilai p
Sangat signifikan ($p < 0.01$)	Kawasan	.000
	Kepanjangan major axis	.000
	Kepanjangan minor axis	.000
	Diameter setara	.000
	Perimeter	.000
Signifikan ($p < 0.05$)	Eksentrik	.008
	Kekukuhan	.002
	Keluasan	.001

Jadual 4.19 menunjukkan keputusan ciri-ciri morfologi optimum yang membezakan antara UPK-GM dengan UPK-M pada pembesaran $\times 20$. Jadual 4.19 menunjukkan ciri eksentrik dan perimeter merupakan ciri morfologi yang signifikan ($p < 0.05$) manakala ciri kawasan, kepanjangan major axis, kepanjangan minor axis, diameter setara, kekukuhan dan keluasan adalah ciri morfologi tidak signifikan ($p > 0.05$) bagi pembezaan antara UPK-GM dengan UPK-M. Secara ringkas, eksentrik

dan perimeter merupakan ciri-ciri morfologi optimum bagi pembezaan antara UPK-GM dengan UPK-M pada pembesaran $\times 20$.

Jadual 4.19 Keputusan ciri morfologi optimum yang membezakan antara UPK-GM dengan UPK-M pada pembesaran $\times 20$

	Ciri morfologi	Nilai p
Signifikan ($p < 0.05$)	Eksentrik	.004
	Perimeter	.019
Tidak signifikan ($p > 0.05$)	Kawasan	.094
	Kepanjangan major axis	.068
	Kepanjangan minor axis	.060
	Diameter setara	.094
	Kekukuhan	.289
	Keluasan	.537

Jadual 4.20 menunjukkan ringkasan keputusan ciri-ciri morfologi optimum bagi pembezaan antara jenis UPK progenitor mieloid (UPK-GM, UPK-G dan UPK-M) pada pembesaran $\times 20$. Jadual 4.20 menunjukkan kekukuhan dan keluasan merupakan ciri morfologi optimum bagi membezakan UPK-G daripada UPK-GM dan UPK-M manakala eksentrik dan perimeter merupakan ciri morfologi optimum bagi membezakan UPK-M daripada UPK-G dan UPK-GM pada pembesaran $\times 20$. Namun, tiada ciri morfologi optimum yang berupaya membezakan UPK-GM daripada UPK-M dan UPK-G. Dengan itu, tiada ciri morfologi optimum yang berupaya membezakan antara ketiga-tiga jenis UPK progenitor mieloid pada pembesaran $\times 20$.

Jadual 4.20 Ringkasan ciri-ciri morfologi optimum bagi pembezaan antara jenis UPK progenitor mieloid pada pembesaran $\times 20$

Pembezaan UPK	Ciri morfologi optimum
Antara UPK-G dengan UPK-GM	Kekukuhan, keluasan
Antara UPK-G dengan UPK-M	Kawasan, kepanjangan major axis, kepanjangan minor axis, diameter setara, eksentrik, kekukuhan, keluasan, perimeter
Antara UPK-M dengan UPK-GM	Eksentrik, perimeter

4.3.4 Ciri morfologi optimum yang membezakan jenis UPK progenitor mieloid pada pembesaran $\times 40$

Berdasarkan hasil analisis penentuan ciri-ciri morfologi UPK, tiada ciri morfologi UPK progenitor mieloid dikenalpasti pada pembesaran $\times 40$. Tiada data boleh digunakan untuk analisa seterusnya untuk membezakan jenis UPK progenitor berketurunan

mieloid. Oleh itu, ujian *Mann Whitney U* pada pembesaran $\times 40$ tidak dijalankan. Ini juga menunjukkan tiada ciri morfologi optimum bagi membezakan jenis UPK progenitor mieloid pada pembesaran $\times 40$.

4.3.5 Ringkasan ciri-ciri morfologi yang membezakan jenis UPK progenitor mieloid pada pembesaran $\times 4$, $\times 10$, $\times 20$ dan $\times 40$

Jadual 4.21 menunjukkan ringkasan ciri-ciri morfologi optimum yang membezakan jenis UPK progenitor mieloid (UPK-GM, UPK-G dan UPK-M) pada pembesaran $\times 4$, $\times 10$, $\times 20$ dan $\times 40$. Secara ringkas, keputusan telah menunjukkan ciri eksentrik pada pembesaran $\times 4$ serta ciri kawasan dan diameter setara pada pembesaran $\times 10$ merupakan ciri-ciri morfologi yang paling optimum bagi pembezaan antara jenis UPK progenitor mieloid (UPK-GM, UPK-G dan UPK-M). Tiada ciri morfologi optimum yang berupaya membezakan antara ketiga-tiga jenis UPK progenitor keturunan mieloid pada pembesaran $\times 20$ dan $\times 40$. Secara keseluruhan, ciri morfologi optimum yang membezakan antara jenis UPK progenitor mieloid (UPK-GM, UPK-G dan UPK-M) hanya didapati pada pembesaran tertentu sahaja iaitu ciri eksentrik pada pembesaran $\times 4$ serta ciri diameter setara dan kawasan pada pembesaran $\times 10$.

Jadual 4.21 Ringkasan ciri morfologi optimum yang membezakan jenis UPK progenitor mieloid pada pembesaran $\times 4$, $\times 10$, $\times 20$, dan $\times 40$

Pembesaran	UPK-G/UPK-GM	UPK-G/UPK-M	UPK-GM/UPK-M
$\times 4$	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Sentroid (x-koordinat) ▪ Eksentrik 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Sentroid (x-koordinat) ▪ Eksentrik 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Sentroid (y-koordinat) ▪ Eksentrik
$\times 10$	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Kawasan ▪ Diameter setara ▪ Kepanjangan major axis 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Kawasan ▪ Diameter setara ▪ Kepanjangan major axis ▪ Kepanjangan minor axis ▪ Eksentrik ▪ Perimeter 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Kawasan ▪ Diameter setara ▪ Kepanjangan minor axis ▪ Eksentrik ▪ Orientasi ▪ Perimeter
$\times 20$	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Kekukuhan ▪ Keluasan 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Kawasan ▪ Kepanjangan major axis ▪ Kepanjangan minor axis ▪ Diameter setara ▪ Eksentrik ▪ Kekukuhan ▪ Keluasan ▪ Perimeter 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Eksentrik ▪ Perimeter
$\times 40$	-	-	-

BAB V

PERBINCANGAN

Pemprosesan imej digital adalah penggunaan komputer digital untuk memproses imej digital melalui algoritma (Dvanesh et al. 2018). Pemprosesan imej digital boleh digunakan dalam pelbagai bidang. Contohnya, dalam bidang pembinaan, kaedah *Terrestrial Laser Scanning* (TLS) digunakan untuk mengumpulkan maklumat kuantitatif and kualitatif melalui imej 3D supaya dapat memantau kerosakan dan menilai keadaan struktur pembinaan. Di samping itu, kaedah pemprosesan imej digital juga boleh digunakan dalam industri makanan untuk memastikan keselamatan dan piawai makanan. Sebagai contoh, buah oren yang rosak akan menyebabkan bahagian kerosakan tersebut mempunyai warna berlainan seperti warna coklat. Dengan menggunakan kaedah pemprosesan imej digital, dapat mencari kawasan kerosakan tersebut melalui analisa imej RGB (*Red, Blue and Green*) dengan analisa piksel imej. Tatacara aplikasi pemprosesan imej digital adalah lebih kurang sama dalam pelbagai bidang iaitu menyaringkan imej input sebelum pra-pemprosesan, segmentasi imej, menentukan kawasan atau objek yang perlu dianalisa, pengekstrakan ciri dan klasifikasi berdasarkan ciri-ciri tertentu (Prabaharan et al. 2020).

Mekanisme pemprosesan imej semakin berkembang dalam bidang perubatan untuk meningkatkan tahap pengesanan dan rawatan. Kajian-kajian yang menggunakan pemprosesan imej digital dalam bidang perubatan termasuk, pengesanan sel darah putih (Sadeghian et al. 2009), pengiraan sel darah (Dvanesh et al. 2018), pengesanan sel kanser (Patil & Jain 2014), klasifikasi sel B limfoid atipikal (Alferez et al. 2014), pengenalanpastian sel bakteria berflagelum atau berfimbria (Hiremath et al. 2012) dan sebagainya. Kaedah yang digunakan untuk mengekstrak ciri-ciri morfologi dalam kajian ini ialah *regionprops*. Beberapa kajian telah menggunakan kaedah yang sama dalam penelitian ciri morfologi imej. Contohnya, kajian yang mengkaji klasifikasi gambar gigitan ular untuk menentukan gigitan tersebut digigit oleh ular yang berbisa

atau tidak berbisa (Pamungkas et al. 2020), kajian yang mengenalpasti nombor plat secara automasi (Sharma et al. 2019), kajian tentang pengekstrakan ciri keretakan tulang daripada imej X-ray (Zheng et al. 2009) dan kajian tentang pengenalanpasti penyakit retina melalui imej retina (Omar et al. 2014).

Ciri morfologi merupakan ciri yang dikaji dalam kajian ini kerana ciri morfologi adalah parameter yang penting dalam penyelidikan terhadap pelbagai bidang. Terdapat pelbagai kajian yang mengekstrak ciri morfologi daripada imej untuk menjalankan penyelidikan. Contohnya, kajian oleh Tiwari et al. (2009) serta kajian oleh Nazah dan Islam (2017) yang menganalisa ciri morfologi melalui pemprosesan imej digital untuk mengenalpasti muka individu yang berbeza. Selain itu, kajian oleh Manik et al. (2016) yang menggunakan ciri morfologi seperti eksentrik, kepanjangan, kebulatan, kekukuhan, konvesiti dan kekompakan untuk mengenalpasti jenis penyakit pada daun *Antocephalus cadamba*. Penilaian ciri morfologi juga menjadi semakin penting dalam bidang perubatan kerana ciri ini cekap dalam penganalisis pelbagai jenis penyakit. Contohnya, kajian oleh Park et al. (2014), yang mengkaji perbezaan morfologi antara sel tumor beredar (*circulating tumor cells*) daripada pesakit kanser prostat dengan sel kanser prostat yang dikultur untuk menentukan sel yang lebih sesuai untuk digunakan dalam mengenalpasti penyakit kanser prostat. Kajian yang dijalankan oleh Matsuoka et al. (2013) juga memantau morfologi sel untuk menilai potensi pembezaan sel osteogenik dalam sel stem mesenkima untuk memajukan bidang perubatan regeneratif melalui kaedah automasi.

Sel stem hematopoietik (SSH) memainkan peranan yang penting dalam proses hematopoiesis iaitu menghasilkan sel darah matang seperti sel darah merah, sel darah putih dan platelet (Wei & Frenette 2018). Aplikasi SSH juga menyumbangkan kebaikan dalam bidang perubatan seperti sum-sum tulang tranplantasi, rawatan kanser darah dan regenerasi sel darah (Müller et al. 2016 ; Nakamura-Ishizu et al. 2020 ; Stuckey & Shah 2014). Dengan perkembangan teknologi, penyelidikan SSH turut menggunakan kaedah automasi untuk mencapai keputusan yang lebih cekap dan tepat. Antara kajian yang mengkaji SSH menggunakan kaedah automasi seperti kajian oleh Reta et al. (2015) bertujuan mengenalpasti jenis penyakit leukemia melalui penganalisa morfologi SSH dengan menggunakan algoritma segmentasi dan klasifikasi yang telah dibina. Hasil

kajiannya juga membuktikan keberkesanan dan ketepatan sistem automasi tersebut dalam analisa sel stem. Selain itu, kajian yang dijalankan oleh Hoshikawa et al. (2019) mengkaji koloni sel stem keratinosit melalui analisa imej untuk menentukan keupayaan pembezaan sel stem tersebut bagi tujuan pengawalan kualiti dalam rawatan regeneratif. Kajian yang dijalankan oleh Orozco-Fuentes et al. (2019) juga mengkaji ciri morfologi koloni sel stem embrio untuk menentukan pengaruh pengasingan sel dalam koloni terhadap pluripotensi sel stem.

Namun begitu, kajian yang melihat tentang ciri morfologi UPK progenitor mieloid SSH melalui kaedah pemprosesan imej digital merupakan kajian yang novel kerana kajian berkaitan masih kurang dijalankan. Penggunaan kaedah *regionprops* terhadap UPK SSH masih belum meluas sepenuhnya lebih-lebih lagi dalam membezakan jenis UPK sel progenitor keturunan mieloid (UPK-GM, UPK-G dan UPK-M). Kaedah *regionprops* mengukur pelbagai kuantiti dan ciri imej yang berada dalam imej keadaan hitam putih. *Regionprops* digunakan untuk mengekstrak data ciri melalui pemprosesan imej untuk memperoleh data ciri-ciri dari suatu imej. Kombinasi daripada beberapa parameter daripada *regionprops* telah diterapkan untuk mencari tahu parameter yang paling berpengaruh dalam klasifikasi (Pamungkas et al. 2020). Berdasarkan kajian oleh Kavitha et al. (2017) telah menunjukkan ciri morfologi mempunyai ketepatan yang tinggi dalam klasifikasi koloni sel stem pluripoten iaitu sebanyak 95.5% melalui model V-CNN. Dalam kajian ini, sebelas ciri-ciri morfologi telah dikaji termasuk kawasan, sentroid (x-koordinat), sentroid (y-koordinat), diameter setara, perimeter, kekukuhan, keluasan, kepanjangan major axis, kepanjangan minor axis, orientasi dan eksentrik. Penggunaan ciri-ciri morfologi tersebut adalah merujuk kepada kajian Kavitha et al. (2017) serta Kavitha dan Ahn (2018) yang telah berjaya menggunakan ciri-ciri morfologi tersebut dalam menjalankan penyelidikan tentang pengkelasan koloni sel stem pluripoten.

Penetapan yang optimum bagi perolehan imej UPK menunjukkan imej yang berkualiti rendah telah dikecualikan dahulu sebelum pra-pemprosesan dan proses pengekstrakan ciri morfologi. Perolehan dan proses penyaringan imej memerlukan usaha manual bergantung pada jenis imej dan strategi pra-pemprosesan (Rzanny et al. 2017). Pra-pemprosesan memerlukan imej yang mencapai kualiti lengkap seperti tiada

bayangan, mempunyai koloni imej yang jelas, mempunyai struktur koloni yang jelas, latar belakang imej koloni berwarna konsisten, dan imej yang tidak kabur. Oleh itu, imej yang berkualiti rendah telah dikecualikan terlebih dahulu, contohnya imej yang mempunyai bayangan, latar belakang imej koloni yang tidak konsisten, imej koloni yang tidak jelas, imej koloni yang berkabur dan imej yang tidak mempunyai struktur koloni yang jelas.

Hal ini kerana, imej koloni yang tidak lengkap akan mempengaruhi keputusan kajian. Contohnya, latar belakang yang tidak konsisten disebabkan oleh proses perolehan gambar, keadaan pencahayaan, atau imej yang kurang fokus akan mempengaruhi analisa ciri morfologi imej (Soleimani et al. 2017). Kualiti piksel dan pencahayaan adalah faktor penting untuk dipertimbangkan semasa mengumpulkan data kerana kualiti imej yang baik dapat meningkatkan ketepatan maklumat morfologi yang dikumpulkan daripada setiap imej (García-soriano et al. 2021). Oleh itu, pemeriksaan kualiti imej adalah penting untuk mengelakkan imej yang berkualiti rendah akan menyebabkan sistem tidak berupaya mengenalpasti maklumat dalam imej tersebut (Schier & Kovář 2011). Imej berkualiti rendah akan menurunkan ketepatan algoritma dan meningkatkan kesukaran dalam proses analisis imej (Beutel 2018). Dengan itu, imej yang berkualiti rendah akan mempengaruhi ketepatan dalam pengekstrakan ciri morfologi.

Pengenalpastian ciri morfologi UPK progenitor berketurunan mieloid telah menunjukkan eksentrik merupakan ciri morfologi UPK progenitor mieloid yang dikenalpasti pada kebanyakan pembesaran ($\times 4$, $\times 10$, $\times 20$). Di samping itu, eksentrik merupakan ciri morfologi optimum dalam membezakan jenis UPK progenitor mieloid (UPK-GM, UPK-G dan UPK-M) pada pembesaran $\times 4$. Eksentrik selalu dipakai sebagai parameter utama dan kerap digunakan dalam penyelidikan yang berkaitan dengan pengenalpastian koloni melalui teknik pengimejan seperti kajian daripada Beutel (2018), Garcia-soriano et al. (2021), Kavitha dan Ahn (2018) serta Schier dan Kovář (2011). Kajian daripada Baraldi et al. (2013) juga menunjukkan eksentrik merupakan parameter yang berguna dalam mengkaji perubahan bentuk koloni. Selain itu, berdasarkan dapatan kajian oleh Barreiro et al. (2008), koloni berbentuk bulat, dengan pinggir biasa. Kehilangan bulatan dapat dianggar secara kuantitatif oleh indeks

eksentrisiti, E_i , dikira sebagai nisbah antara ortogonal diameter tegak dan diameter melintang. Kajian tersebut telah membuktikan indeks eksentrik merupakan parameter yang baik untuk mengukur perubahan dalam morfologi koloni, untuk mengikuti evolusi berdasarkan pertumbuhan koloni dan untuk membandingkan keluasan antara spesies koloni yang berbeza.

Selain daripada ciri eksentrik pada pembesaran $\times 4$, ciri kawasan dan ciri diameter setara juga merupakan ciri morfologi yang optimum bagi membezakan jenis UPK progenitor mieloid (UPK-GM, UPK-G dan UPK-M) pada pembesaran $\times 10$. Tiada kajian terdahulu boleh digunakan untuk membuat perbandingan kerana kurang data kajian yang berkaitan dengan penyelidikan ciri morfologi UPK progenitor mieloid SSH. Namun, terdapat kajian yang menggunakan parameter kawasan dan diameter setara dalam kajian bidang perubatan dengan menggunakan kaedah pemprosesan imej digital. Kajian daripada Bhaskar et al. (2019) yang mengkaji ciri morfologi untuk sel klasifikasi juga menggunakan ciri kawasan sebagai salah satu parameter. Kajian ini menunjukkan ciri kawasan tidak mudah dipengaruhi oleh gangguan kecil dalam bentuk sel dan mudah dianalisa. Kajian oleh Orozco-Fuentes et al. (2019) juga menunjukkan pembentukan struktur koloni sel stem adalah berkaitan dengan faktor ciri kawasan. Koloni yang mempunyai kawasan yang lebih besar akan mempunyai nukleus sel yang lebih kecil dan jarak antara sel yang lebih pendek. Berdasarkan kajian oleh Kavitha dan Ahn (2018) yang mengkaji ciri morfologi koloni sel stem pluripoten, telah menunjukkan ciri kawasan mempunyai ketepatan prestasi tertinggi dalam mengklasifikasikan koloni sel stem pluripoten melalui model *Gaussian naïve Bayes* (GNB) dan kaedah *k-nearest neighbor* (k-NN). Kajian tersebut juga menunjukkan ciri diameter setara merupakan ciri morfologi ketiga yang berkesan dalam mengklasifikasikan koloni sel stem pluripoten. Berdasarkan kajian oleh Kavitha et al. (2017) telah menunjukkan diameter setara merupakan salah satu parameter yang relevan dalam pengkelasan koloni sel stem pluripoten melalui kaedah *Fisher scores*. Ciri morfologi ini juga membantu bagi pembezaan antara koloni yang sihat dan tidak sihat.

Tiada ciri morfologi signifikan pada pembesaran $\times 40$ dikenalpasti. Hal ini berkemungkinan disebabkan bilangan imej koloni sel stem pada pembesaran $\times 40$ mempunyai bilangan yang paling rendah. Ini mungkin kerana hanya 27 imej akhir yang

dianalisa berbanding dengan bilangan yang melebihi 50 pada pembesaran yang lain ($\times 4$, $\times 10$ dan $\times 20$). Kekurangan imej menyebabkan kekurangan data imej yang dapat diperoleh untuk dianalisa. Di samping itu, juga berkemungkinan disebabkan oleh kekurangan struktur koloni yang jelas atau kurang ciri morfologi yang dapat diperoleh pada pembesaran yang besar. Pembesaran merujuk kepada sejauh mana objek diperbesar. Pembesaran yang tinggi akan mengurangkan kawasan objek yang boleh diperhatikan (Mihlbachler & Beatty 2012). Penglihatan koloni menjadi lebih besar pada pembesaran yang tinggi, lebih kurang struktur koloni dapat diperhatikan dalam satu imej, menjadikan lebih kurang ciri morfologi boleh diekstrak. Hal ini juga menyusahkan keupayaan dalam mengekstrak ciri morfologi UPK SSH. Oleh itu, hasil ini menunjukkan pengenalan ciri morfologi UPK progenitor mieloid (UPK-GM, UPK-G dan UPK-M) tidak sesuai dijalankan pada pembesaran $\times 40$.

Secara ringkas, pada pembesaran $\times 4$, ciri eksentrik merupakan ciri morfologi yang optimum untuk membezakan antara ketiga-tiga jenis UPK progenitor mieloid SSH (UPK-GM, UPK-G dan UPK-M). Pada pembesaran $\times 10$, ciri kawasan dan diameter setara merupakan ciri-ciri morfologi yang optimum untuk membezakan antara ketiga-tiga jenis UPK progenitor mieloid SSH. Pada pembesaran $\times 20$, ciri kekukuhan dan keluasan merupakan ciri morfologi optimum yang membezakan UPK G daripada UPK-GM dan UPK-M manakala eksentrik dan perimeter merupakan ciri morfologi optimum yang membezakan UPK-M daripada UPK-G dan UPK-GM. Namun, tiada morfologi optimum yang berupaya membezakan UPK-GM daripada UPK-G dan UPK-M. Dengan itu, menyebabkan ketiga-tiga jenis UPK progenitor mieloid iaitu UPK-G, UPK-GM dan UPK-M tidak boleh dibezakan dengan menggunakan ciri-morfologi yang tertentu pada pembesaran $\times 20$. Pada pembesaran $\times 40$, tiada ciri morfologi data yang dapat dikaji kerana tiada ciri morfologi dikenalpasti pada pembesaran $\times 40$. Secara keseluruhan, tiada ciri morfologi optimum tertentu berupaya membezakan jenis UPK progenitor mieloid iaitu UPK-G, UPK-GM dan UPK-M pada semua pembesaran yang dikaji iaitu $\times 4$, $\times 10$, $\times 20$ dan $\times 40$. Namun, kajian ini berjaya mengkaji ciri morfologi optimum yang berupaya membezakan antara jenis UPK progenitor mieloid (UPK-GM, UPK-G dan UPK-M) pada pembesaran tertentu iaitu ciri eksentrik pada pembesaran $\times 4$ dan ciri kawasan serta diameter setara pada pembesaran $\times 10$. Walaubagaimanapun, keputusan yang didapati daripada kajian tidak dapat melakukan perbandingan secara terus kerana

kajian terhadap UPK progenitor mieloid masih kurang dijalankan. Perbandingan secara umum hanya dapat dilakukan dengan kajian yang juga menggunakan sampel imej koloni sahaja.

Akhir kata, kurang data kajian lepas boleh digunakan untuk membuat perbandingan dengan kajian novel ini kerana kurang kajian yang sama. Walaupun terdapat kajian tentang digital imej analisa koloni sel stem, namun kajian-kajian tersebut bukan menggunakan kaedah yang sama, tiada membuat perbandingan ciri-ciri morfologi, mengkaji jenis UPK yang tidak sama atau bukan mengkaji keturunan sel stem yang sama. Contohnya, kajian daripada Kato et al. (2016) yang mengkaji koloni sel stem tetapi mengkaji sel stem pluripoten, bukan sel stem multipoten seperti kajian ini. Kajian daripada Kavitha et al. (2017) yang mengkaji ciri-ciri morfologi yang sama dengan kajian ini telah menunjukkan diameter setara, kepanjangan minor axis, kekukuhan dan keluasan merupakan ciri morfologi yang paling relevan dengan pengkelasan koloni sel stem. Namun, kajian tersebut mengkaji koloni sel stem pluripoten dan menggunakan kaedah *Fisher scores* iaitu jenis sel stem dan kaedah yang tidak sama dengan kajian ini. Di dalam kajian ini, mengkaji jenis UPK progenitor berketurunan mieloid serta pemilihan ciri morfologi signifikan dan optimum adalah berdasarkan menggunakan kaedah *regionprops* melalui perisian MATLAB. Oleh itu, perbandingan hasil tidak boleh dijalankan antara jenis dan keturunan sel stem serta kaedah yang tidak sama antara dua kajian.

Secara keseluruhan, kajian ini dijalankan adalah untuk memberi data dalam perkembangan mesin yang dapat mengenalpasti dan mengelaskan koloni SSH secara automasi supaya dapat mengurangkan keputusan ralat dalam analisa yang disebabkan oleh kaedah manual dan dapat meningkatkan ketepatan dalam pembezaan UPK progenitor mieloid SSH. Melalui kajian ini, pendekatan pemprosesan imej digital berpotensi bagi penyelidikan ciri-ciri morfologi UPK SSH.

BAB VI

KESIMPULAN

6.1 KESIMPULAN KAJIAN

Hasil daripada kajian ini menunjukkan eksentrik merupakan ciri morfologi UPK progenitor berketurunan mieloid (UPK-GM, UPK-G dan UPK-M) yang dikenalpasti pada kebanyakan pembesaran iaitu $\times 4$, $\times 10$ dan $\times 20$. Ciri eksentrik pada pembesaran $\times 4$ serta ciri kawasan dan diameter setara pada pembesaran $\times 10$ merupakan ciri-ciri morfologi yang optimum bagi pembezaan antara jenis UPK progenitor berketurunan mieloid (UPK-GM, UPK-G dan UPK-M). Tiada ciri morfologi optimum yang berupaya membezakan antara ketiga-tiga jenis UPK progenitor berketurunan mieloid (UPK-GM, UPK-G dan UPK-M) pada pembesaran $\times 20$ dan $\times 40$. Secara keseluruhan, tiada ciri morfologi optimum tertentu berupaya membezakan jenis UPK progenitor keturunan mieloid (UPK-GM, UPK-G dan UPK-M) pada semua pembesaran yang dikaji ($\times 4$, $\times 10$, $\times 20$ dan $\times 40$). Ciri morfologi yang optimum hanya didapati pada pembesaran tertentu sahaja iaitu ciri eksentrik pada pembesaran $\times 4$ serta ciri kawasan dan diameter setara pada pembesaran $\times 10$. Oleh itu, dapat dirumuskan bahawa ciri eksentrik pada pembesaran $\times 4$ serta ciri kawasan dan diameter setara pada pembesaran $\times 10$ berpotensi untuk dibangunkan sebagai ciri automasi untuk pengkelasan dan pengenalpastian jenis UPK progenitor mieloid berbeza keturunan dan komitmen pembezaan.

6.2 CADANGAN KAJIAN LANJUTAN

- a) Memperbanyakkan bilangan ciri morfologi yang akan diekstrakan

Pembacaan yang kompleks daripada algoritma yang dibina memberikan satu kelebihan untuk membolehkan menganalisa data yang banyak. Oleh itu, bilangan ciri yang banyak diperlukan untuk mencari ciri yang lebih optimum dalam membezakan UPK-GM, UPK-G dan UPK-M.

- b) Memperbanyak dan menyeimbangkan bilangan imej yang digunakan untuk analisis

Memandangkan kajian ini mempunyai bilangan imej yang berbeza dalam analisis. Contohnya, pembesaran $\times 40$ mempunyai 27 imej sahaja yang digunakan dalam analisis manakala pembesaran $\times 10$ mempunyai sebanyak 72 imej. Ketidakseimbangan bilangan imej yang digunakan dalam analisis berkemungkinan mempengaruhi keputusan.

- c) Membinakan algoritma yang berupaya menyaringkan imej berkualiti rendah secara automatik

Memandangkan proses penyaringan imej kualiti rendah dalam kajian ini adalah menggunakan kaedah manual disebabkan kekurangan algoritma yang berupaya menyaringkan imej secara automasi pada masa semasa. Hal ini mungkin akan menimbulkan masalah iaitu menyebabkan variasi dalam penelitian antara individu yang berbeza. Oleh itu, algoritma penyaringan imej dapat menyeragamkan kualiti imej yang akan digunakan dalam analisis seterusnya dan menghasilkan keputusan yang lebih tepat.

RUJUKAN

- Al-amri, S.S., Kalyankar, N.V. & Khamitkar, S.D. 2010. Image Segmentation by Using Threshold Techniques. *Journal of Computing* 2(5): 83–86.
- Alenzi, F.Q., Alenazi, B. Q., Ahmad, S.Y., Salem, M.L., Al-Jabri, A.A. & Wyse, R.K. H. 2009. The haemopoietic stem cell: Between apoptosis and self renewal. *Yale Journal of Biology and Medicine* 82(1): 7-18
- Alférez, S., Merino, A., Mujica, L.E., Ruiz, M., Bigorra, L. & Rodellar, J. 2014. Automatic classification of atypical lymphoid B cells using digital blood image processing. *International Journal of Laboratory Hematology* 36(4): 472–480.
- Bangare, S. L., Dubal, A., Bangare, P.S. & Patil, S.T. 2015. Reviewing otsu’s method for image thresholding. *International Journal of Applied Engineering Research* 10(9): 21777–21783.
- Baraldi, M.M., Alemi, A.A., Sethna, J.P., Caracciolo, S., La Porta, C.A.M. & Zapperi, S. 2013. Growth and form of melanoma cell colonies. *Journal of Statistical Mechanics: Theory and Experiment* 2013(2): 1–14.
- Bhaskar, D., Lee, D., Knútsdóttir, H., Tan, C., Zhang, M., Dean, P., Roskelley, C., Keshet, L.E. 2019. A methodology for morphological feature extraction and unsupervised cell classification. *Journal bioRxiv* 2019(1): 1-30
- Boltz-Nitulescu, G., Wiltschke, C., Holzinger, C., Fellingner, A., Scheiner, O., Gessl, A. & Forster, O. 1987. Differentiation of rat bone marrow cells into macrophages under the influence of mouse L929 cell supernatant. *Journal of Leukocyte Biology* 41(1): 83-91
- Bryder, D., Rossi, D.J. & Weissman, I.L. 2006. Hematopoietic stem cells: The paradigmatic tissue-specific stem cell. *American Journal of Pathology* 169(2): 339-344
- Buksh, R., Routh, S., Mitra, P., Banik, S., Mallik, A. & Gupta, S.D. 2014. Implementation of MATLAB based object detection technique on Arduino Board and iROBOT CREATE. *International Journal of Scientific and Research Publications* 4(1): 1-5
- Cazacu, R. 2021. Matlab framework for image processing and feature extraction flexible algorithm design. *Journal of Proceedings* 63(1): 72.
- Chen, S., Zhao, M., Wu, G., Yao, C. & Zhang, J. 2012. Recent advances in morphological cell image analysis. *Computational and Mathematical Methods in Medicine* 2012(1): 1-10

- Chu, D.T., Nguyen, T.T., Tien, N.L.B., Tran, D.K., Jeong, J.H., Anh, P.G., Thanh, V.V. 2020. Recent Progress of Stem Cell Therapy in Cancer Treatment: Molecular Mechanisms and Potential Applications. *Journal of cells* 9(3): 1-19
- Dee Lawlor. 2018. Automated Image Analysis – the Future of Data Acquisition. <https://bitesizebio.com/38138/automated-image-analysis-the-future-of-data-acquisition/> [6 March 2018]
- Dijkstra, T. 1994. Image processing, analysis and machine vision. *Neurocomputing* 6(3): 378-379
- Doulgeroglou, M.N., Di Nubila, A., Niessing, B., König, N., Schmitt, R.H., Damen, J., Szilvassy, S.J. 2020. Automation, Monitoring, and Standardization of Cell Product Manufacturing. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* 8(1): 1-9
- Dvanesh, V.D., Lakshmi, P.S., Reddy, K. & Vasavi, A.S. 2018. Blood cell count using digital image processing. *Proceedings of the 2018 International Conference on Current Trends towards Converging Technologies* 2018(1): 1–7.
- Egeler, O., Grande, C., Yuan, N., Wognum, B., Woodside, S., Booth, A., Szilvassy, S. J. 2013. Stemvision™: a bench-top instrument for auto-mated and standardized counting of all hematopoietic colony types in CFU assays of human bone marrow, cord blood and mobilized peripheral blood cells. *Cytotherapy* 15(4): S51.
- Egeler, O., Wognum, A.W., Grande, C., Yuan, N., Woodside, S. & Thomas, T. 2011. Automation of the Hematopoietic CFC Assay for Human Cord Blood, Bone Marrow and Mobilized Peripheral Blood Samples. *Blood* 118(21): 3001–3001.
- Elena Gil de Prado, Eva-María Rivas, María-Isabel de Silóniz, Belén Diezma, Pilar Barreiro, J.M.P. 2008. Identification of an NADH-dependent 5-hydroxymethylfurfural-reducing alcohol dehydrogenase in. *Yeast* 31(11) 431-440.
- Epiphany, J.L. 2014. On Teaching Digital Image Processing with MATLAB. *American Journal of Signal Processing* 4(1): 7-15
- García-soriano, D.A., Andersen, F.D. & Nygaard, J.V. 2021. ColFeatures : Automated data extraction and classification of bacterial colonies. *Biotechnological and Chemical Engineering* 2021(16): 1-10.
- Glicksman, M.A. 2018. Induced Pluripotent Stem Cells: The Most Versatile Source for Stem Cell Therapy. *Clinical Therapeutics* 40(7): 1060–1065.
- Guo, L., Hamre, J., Davis, M. & Parchment, R.E. 2016. Human CD34+ progenitor hematopoiesis in liquid culture for in vitro assessment of drug-induced myelotoxicity. *Toxicology in Vitro* 31(1): 103-113.

- Halpenny, M., Elmoazzen, H., Martin, L., Mostert, K., Allan, D., Petraszko, T., Dibdin, N. 2015. Numeration of colony-forming unit-granulocyte-macrophage (CFU-GM) colonies in cord blood by using an automated instrument: Stemvision. *Transfusion*. 55(1): 52A
- Hatzimichael, E. & Tuthill, M. 2010. Hematopoietic stem cell transplantation. *Stem Cells and Cloning: Advances and Applications* 3(1): 105-117
- Hayretdağ, C. & Coşkunpınar, E.M. 2019. Stem cells and regenerative medicine. *Turkish Journal of Immunology* 7(1): 50-56
- Hiremath, S.P, Bannigidad, P., Yelgond, S. 2012. Identification of Flagellated or Fimbriated Bacterial Cells using Digital Image Processing Techniques. *International Journal of Computer Applications* 59(12): 12–16.
- Hoshikawa, E., Sato, T., Kimori, Y., Suzuki, A., Haga, K., Kato, H., Tabeta, K. 2019. Noninvasive measurement of cell/colony motion using image analysis methods to evaluate the proliferative capacity of oral keratinocytes as a tool for quality control in regenerative medicine. *Journal of Tissue Engineering* 10(1): 1-12
- Kato, R., Matsumoto, M., Sasaki, H., Joto, R., Okada, M., Ikeda, Y., Kanie, K., et al. 2016. Parametric analysis of colony morphology of non-labelled live human pluripotent stem cells for cell quality control. *Scientific Reports* 6(1): 1-10.
- Kavitha, M.S. & Ahn, B.C. 2018. Computerized colony classification of induced pluripotent stem cells using gaussian naïve bayes model on phase contrast images. *Biomedical Research (India)* 29(10): 2142–2146.
- Kavitha, M.S., Kurita, T., Park, S.Y., Chien, S.I, Bae, J.S. & Ahn, B.C. 2017. Deep vector-based convolutional neural network approach for automatic recognition of colonies of induced pluripotent stem cells. *PLoS ONE* 12(12): 1–18.
- Khojasteh, M., Walasek, M.A., Wognum, A.W., Szilvassy, S.J., Egeler, O., Woodside, S., Poon, S. 2015. Automated imaging and analysis of hematopoietic CFU assays of mouse bone marrow. *Experimental Hematology* 43(9): S99.
- Kim, J.J., Vega, S.L. & Moghe, P.V. 2019. Imaging and Tracking Stem Cells: A High Content Imaging-Based Approach for Classifying Cellular Phenotypes. *Methods Molecular Biology* 2013(1052): 41-48
- Kondo, M., Wagers, A.J., Manz, M.G., Prohaska, S.S., Scherer, D.C., Beilhack, G.F., Shizuru, J.A. 2003. Biology of hematopoietic stem cells and progenitors: Implications for clinical application. *Annual Review of Immunology* 21(1): 759-806
- Kronstein-Wiedemann, R. & Tonn, T. 2019. Colony Formation: An Assay of

- Hematopoietic Progenitor Cells. *Methods in Molecular Biology* 2017(1): 29–40.
- Kumar, A., D'Souza, S.S. & Thakur, A.S. 2019. Understanding the journey of human hematopoietic stem cell development. *Stem Cells International* 2019(11): 1-13
- Lerou, P.H. & Daley, G.Q. 2005. Therapeutic potential of embryonic stem cells. *Blood Reviews* 19(6): 321–331.
- Mahalingaiah, P.K., Palenski, T. & Van Vleet, T.R. 2018. An In Vitro Model of Hematotoxicity: Differentiation of Bone Marrow–Derived Stem/Progenitor Cells into Hematopoietic Lineages and Evaluation of Lineage-Specific Hematotoxicity. *Current Protocols in Toxicology* 76(1): 1-18
- Manik, F.Y., Herdiyeni, Y. & Herliyana, E.N. 2016. Leaf Morphological Feature Extraction of Digital Image Anthocephalus Cadamba. *Telkomnika Telecommunication Computing Electronics and Control* 14(2): 630-637
- Marquard, D., Austerjost, J., Düsterloh, S., Schneider-Barthold, C., Beutel, S.T. 2018. A Novel Image Analyzing Algorithm for Colony Plate Counting with Handheld Devices. *Advances in Biotechnology & Microbiology* 11(1): 26-32.
- Matsuoka, F., Takeuchi, I., Agata, H., Kagami, H., Shiono, H., Kiyota, Y., Honda, H. 2013. Morphology-Based Prediction of Osteogenic Differentiation Potential of Human Mesenchymal Stem 8(2): 1-12
- Mihlbachler, M.C. & Beatty, B.L. 2012. Magnification and resolution in dental microwear analysis using light microscopy. *Palaeontologia Electronica* 15(3): 1-13.
- Morgan, R.A., Gray, D., Lomova, A. & Kohn, D.B. 2017. Hematopoietic Stem Cell Gene Therapy: Progress and Lessons Learned. *Cell Stem Cell* 21(5): 574–590.
- Müller, A.M., Huppertz, S. & Henschler, R. 2016. Hematopoietic stem cells in regenerative medicine: Astray or on the path? *Transfusion Medicine and Hemotherapy* 43(4): 247–254.
- Nakahata, T. & Ogawa, M. 1982. Identification in culture of a class of hemopoietic colony-forming units with extensive capability to self-renew and generate multipotential hemopoietic colonies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 79(12 I): 3843–3847.
- Nakamura-Ishizu, A., Ahmad, S.A.I. & Suda, T. 2020. Bone marrow transplantation dynamics: When progenitor expansion prevails. *Trends in Cell Biology* 30(11): 835-836
- Nazah, S. & Islam, M. 2017. Face Recognition using Morphological Analysis of

- Images. *Global Journal of Computer Science and Technology: F Graphics & vision* 17(3): 17-19
- Ng, A.P. & Alexander, W.S. 2017. Haematopoietic stem cells: Past, present and future. *Cell Death Discovery* 2017(3): 2–5.
- Omar, M., Hossain, A., Zhang, L. & Shum, H. 2014. An intelligent mobile-based automatic diagnostic system to identify retinal diseases using mathematical morphological operations. *SKIMA 2014 - 8th International Conference on Software, Knowledge, Information Management and Applications* 2014(1): 1–5.
- Orozco-Fuentes, S., Neganova, I., Wadkin, L.E., Baggaley, A.W., Barrio, R.A., Lako, M., Shukurov, A. 2019. Quantification of the morphological characteristics of hESC colonies. *Scientific Reports* 9(1): 1–11.
- Pamphilon, D., Selogie, E., Mckenna, D., Cancelas-Peres, J.A., Szczepiorkowski, Z.M., Sacher, R., McMannis, J. 2013. Current practices and prospects for standardization of the hematopoietic colony-forming unit assay: A report by the cellular therapy team of the Biomedical Excellence for Safer Transfusion (BEST) Collaborative. *Cytotherapy* 15(3): 255-262.
- Pamungkas, Y.W., Adiwijaya, A. & Utama, D.Q. 2020. Klasifikasi gambar gigitan Ular menggunakan Regionprops dan algoritma decision tree. *Jurnal Sistem Komputer dan Informatika (JSON)* 1(2): 69.
- Park, S., Ang, R.R., Duffy, S.P., Bazov, J., Chi, K.N., Black, P.C. & Ma, H. 2014. Morphological differences between circulating tumor cells from prostate cancer patients and cultured prostate cancer cells 9(1): 1-5
- Patil, B.G. & Jain, S.N. 2014. Cancer cells detection using digital image processing methods. *International Journal of Latest Trends in Engineering and Technology* 3(4): 45–49.
- Pereira, C., Clarke, E. & Damen, J. 2007. Hematopoietic colony-forming cell assays. *Stem Cell Assays* 407(1): 177-205
- Pinidiyaarachchi, A. 2009. Digital image analysis of cells: applications in 2D, 3D and time. *Digital Comprehensive Summaries of Uppsala Dissertations from the Faculty of Science and Technology* 57(1): 1-57.
- Prabakaran, T., Periasamy, P., Mugendiran, V. & Ramanan. 2020. Studies on application of image processing in various fields: An overview. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering* 961(1): 1-11.
- Reta, C., Altamirano, L., Gonzalez, J.A. & Diaz-hernandez, R. 2015. Segmentation and classification of bone marrow cells images using contextual information for

- medical diagnosis of acute leukemias 10(16): 1–18.
- Rzanny, M., Seeland, M., Wäldchen, J. & Mäder, P. 2017. Acquiring and preprocessing leaf images for automated plant identification: Understanding the tradeoff between effort and information gain. *Plant Methods* 13(1): 1–11.
- Sadeghian, F., Seman, Z., Ramli, A.R., Abdul Kahar, B.H. & Saripan, M.I. 2009. A framework for white blood cell segmentation in microscopic blood images using digital image processing. *Biological Procedures Online* 11(1): 196–206.
- Scadden, D. T. 2019. Stem cells. *Molecular Hematology* 50(2): 21–36
- Schier, J. & Kovář, B. 2011. Automated counting of yeast colonies using the fast radial transform algorithm. *Bioinformatics 2011 - Proceedings of the International Conference on Bioinformatics Models, Methods and Algorithms* 2011(1): 22–27.
- Sharma, P., Mansotra, K., Gupta, N., Goswami, A., Sharma, S. 2019. Automatic Number Plate Detection. *International Journal of Scientific and Technical Advancements* 5(1): 50–55
- Simpson, E. & Dazzi, F. 2019. Bone marrow transplantation 1957-2019. *Frontiers in Immunology*. 10(1): 1-5
- Skific, M. & Golemovic, M. 2019. Colony-forming unit assay as a potency test for hematopoietic stem/progenitor cell products. *Molecular and experimental biology in medicine* 2(2): 51–56.
- Soleimani, S., Mirzaei, M. & Toncu, D.C. 2017. A new method of SC image processing for confluence estimation. *Micron* 101(1): 206–212.
- Stuckey, D.W. & Shah, K. 2014. Stem cell-based therapies for cancer treatment: Separating hope from hype. *Nature Reviews Cancer* 14(10): 683-691
- Tiwari, R., Shukla, A., Prakash, C., Sharma, D., Kumar, R. & Sharma, S. 2009. Face recognition using morphological method. *IEEE International Advance Computing Conference, IACC* 2009 (1): 529–534.
- Tripura, C. & Pande, G. 2013. Applications of human hematopoietic stem cells isolated and expanded from different tissues in regenerative medicine. *Regenerative Medicine* 8(6): 783–795.
- Velier, M., Chateau, A.L., Malenfant, C., Ouffai, S., Calmels, B., Chabannon, C. & Lemarie, C. 2019. Validation of a semi automatic device to standardize quantification of Colony-Forming Unit (CFU) on hematopoietic stem cell products. *Cytotherapy* 21(8): 820–823.

- Wei, Q. & Frenette, P.S. 2018. Niches for Hematopoietic Stem Cells and Their Progeny. *Immunity: Cell Press* 48(4): 632-648
- Wilkinson, A.C. & Yamazaki, S. 2018. The hematopoietic stem cell diet. *International Journal of Hematology* 107(6): 634–641.
- Wognum, B., Yuan, N., Lai, B. & Miller, C.L. 2013. Colony forming cell assays for human hematopoietic progenitor cells. *Methods in Molecular Biology* 946(1): 267–283.
- Xu, Y., Liu, L., Zhang, L., Fu, S., Hu, Y., Wang, Y., Fu, H. 2012. Efficient commitment to functional cd34+ progenitor cells from human bone marrow mesenchymal stem-cell-derived induced pluripotent stem cells. *PLoS ONE* 7(4): 1–10.
- Zheng, W., Ma, N., Sun, H. & Fan, H. 2009. Feature extraction of X-ray fracture image and fracture classification. *2009 International Conference on Artificial Intelligence and Computational Intelligence, AICI* 2009(2): 408–412.

LAMPIRAN A**IMEJ MENTAH UNIT PEMBENTUK KOLONI PROGENITOR MIELOID**

1. Imej mentah UPK-G

<https://drive.google.com/drive/folders/1ITbKhNvG6BVUNWt8Ycp5pRru4KmpWKlQ>

2. Imej mentah UPK-GM

<https://drive.google.com/drive/folders/16pc9vUuvOAJitMn0Jpo9GwZwoFVjNt4m>

3. Imej mentah UPK-M

<https://drive.google.com/drive/folders/1Mcd1b2FxDtewe2Q04gBVp9mli78WqKoJ>

LAMPIRAN B

KAEDAH ISOLASI SEL SUM-SUM TULANG MENCIT

1. Penyediaan Sel Sum-sum Tulang (SST) daripada Mencit ICR

- a) Mencit dikorbankan melalui teknik dislokasi servikal di dalam rumah haiwan.
- b) Sebelum memasukkan mencit ke beg autoklaf, mencit tersebut disemburkan dengan alkohol isopropil 70%.
- c) Proses pengisolasian sum-sum tulang (SST) dijalankan dalam kebuk aliran lamina untuk mendapatkan sum-sum tulang (SST) yang steril.
- d) Mencit diletakkan di atas piring petri dan bulu mencit dibasahkan dengan alkohol isopropil 70%.
- e) Kulit di bawah tulang rusuk dipotong sehingga kebahagian kaki mencit. Pastikan proses pembedahan mencit tidak dikotori dengan darah agar ia dilakukan dengan keadaan steril.
- f) Tuang salin penimbal fosfat (PBS) ke dalam piring petri yang lain untuk diletakkan femur dan tibia yang telah dipotong dari badan mencit.
- g) Potong pada sendi-sendi femur dan tibia mencit dan diletakkan ke dalam piring petri yang diisi dengan salin penimbal fosfat (PBS).
- h) Ambil piring petri yang steril dan lakukan pembersihan tibia dan femur mencit dari sisa kulit, daging dan otot sehingga tinggal tulang yang bersih.
- i) Seterusnya, letak tulang yang bersih ke dalam piring petri yang mengandungi salin penimbal fosfat (PBS).

2. Teknik Pemancuran

Proses diteruskan dengan teknik pemancuran untuk mengisolasi sum-sum tulang yang berada dalam kaviti tulang. Langkah-langkah adalah seperti berikut:

- a) Sediakan picagari 5 ml dan sedut DMEM 2% lalu sambungkan picagari tersebut dengan jarum yang bersaiz 25 gauge.
- b) Potong kedua-dua belah hujung tulang dipotong supaya kaviti tulang terdedah.
- c) Masukkan jarum yang bersambung dengan 5 ml picagari yang berisi DMEM 2% separuh daripada tulang mencit.
- d) Pancutkan DMEM 2% secara perlahan ke dalam tiub pengempar 15 ml.

- e) Lakukan proses yang sama pada hujung sebelah tulang tersebut.
- f) Ulang sehingga kaviti tulang kelihatan putih.
- g) Emparkan tiub pengempar 15 ml yang mempunyai sum-sum tulang yang telah diisolasi daripada teknik pemancuran di atas pada kelajuan 2500 rpm selama 7 min.
- h) Buang bahagian supernatan ke dalam botol sisa.
- i) Ambil 5 ml DMEM 1% dan masukkan ke dalam tiub pengempar 15 ml yang mempunyai mendakan lalu digoncangkan.
- j) Ambil penyaring sel dan letakkan di atas tiub pengempar 50 ml.
- k) Sedut 5 ml DMEM 1% daripada tiub pengempar 15 ml yang mempunyai mendakan lalu titiskan ke atas penyaring sel tersebut.
- l) Goncangkan penyaring sel tersebut perlahan-lahan untuk membolehkan media tersebut menitis ke dalam tiub pengempar 50 ml (Ia bertujuan untuk menapis komponen selain sel).
- m) Ambil 3 ml DMEM 1% dan masukkan ke dalam tiub pengempar 15 ml yang tadi lalu digoncangkan supaya sel-sel yang melekat pada tiub tertanggal.
- n) Sedut media tersebut dan titiskan ke atas penyaring sel.
- o) Titiskan 2 ml DMEM 1% pada penyaring sel secara perlahan supaya tiada sel yang melekat pada penyaring sel tersebut (Jadikan jumlah 1% DMEM menjadi 10 ml).
- p) Label kelalang kultur T 25 cm² dengan nama dan tarikh dan longgarkan penutupnya.
- q) Sedut 5 ml DMEM 1% di dalam tiub pengempar 50 ml dan masukkan ke dalam kelalang kultur T 25 cm² secara perlahan-lahan.
- r) Titiskan 1 titis DMEM 1% pada piring penimbang untuk lakukan proses pengiraan sel.
- s) Tutup lampu dan pastikan bilik keadaan gelap untuk tambahkan IL-3, IL-6 dan SCF dengan menggunakan mikropipet.
- t) Isipadu bagi sitokin adalah seperti berikut:
 - i. IL-3: 5 µl bagi setiap 10 ml media
 - ii. IL-6: 10 µl bagi setiap 10 ml media
 - iii. SCF: 100 µl bagi setiap 10 ml media

- u) Sum-sum tulang yang dikulturkan dalam kelalang kultur T 25 cm² diletakkan di dalam inkubator dengan suhu 37°C dan CO₂ 5% selama 24 jam sebelum digunakan dalam eksperimen.

3. Pengiraan Sel

- a) Pada piring penimbang, 1 titis DMEM 1% dititis, untuk lakukan proses pengiraan sel dengan anggaran 20 µl.
- b) Tambahkan larutan tripan biru 20 µl ke atas piring penimbang yang sama dan campurkan kedua-dua tersebut.
- c) Ambil 20 µl daripada campuran larutan tersebut dan letakan pada hemositometer untuk lakukan pengiraan pada sel yang hidup.
- d) Sel hidup akan kelihatan bersinar manakala sel yang mati akan kelihatan berwarna biru.
- e) Pengiran sel dilakukan dengan mengira jumlah sel yang hidup pada empat petak yang besar pada hemositometer.
- f) Di bawah adalah formula untuk pengiraan sel:

$$[Jumlah\ sel] = \frac{A + B + C + D}{4} \times 10^4 \times 2$$

A, B, C, D mewakili kawasan petak besar pada hemositometer