

KETERKAITAN JUMLAH DAERAH TERMUTASI PADA GEN β -GLOBIN DENGAN INDEKS KORPUSKULAR PEMBAWA SIFAT β -THALASSEMIA

RELATIONSHIP BETWEEN THE NUMBER OF MUTATED REGION ON β -GLOBIN GENE WITH CORPUSCULAR INDEX ON β -THALASSEMIA CARRIER

Priyambodo¹

Jurusan Biologi FMIPA Universitas Lampung
[*priyambodo@fmipa.unila.ac.id](mailto:priyambodo@fmipa.unila.ac.id)

Abstrak

Thalassemia merupakan kelainan genetik yang disebabkan karena mutasi titik pada gen penyandi rantai globin yang mengakibatkan penurunan indeks korpuskular pada penderita thalassemia, termasuk pada pembawa sifat thalassemia. Tiga hingga lima persen dari total penduduk Indonesia merupakan pembawa sifat thalassemia, dengan kasus tertinggi adalah β -thalassemia. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui hubungan antara jumlah daerah termutasi pada gen β -globin dengan penurunan indeks korpuskular pada pembawa sifat β -thalassemia. Data diambil pada tahun 2012-2013 di Yogyakarta. Analisis indeks korpuskular meliputi *mean corpuscular volume (MCV)*, *mean corpuscular haemoglobin (MCH)*, and *mean corpuscular haemoglobin concentration (MCHC)* dilakukan di laboratorium Prodia. Analisis molekuler dengan metode *polymerase chain reaction-single stand conformation polymorphism (PCR-SSCP)* dilakukan di Laboratorium Genetika dan Laboratorium Falitma, Fakultas Biologi, Universitas Gadjah Mada. Dari total 96 individu yang melakukan skrining, terdapat 9 individu terduga pembawa sifat β -thalassemia dengan 1 daerah termutasi pada gen β -globin menunjukkan rerata MCV 63,1 fl, MCH 19,76 pg dan MCHC 32,34 g/dl. Tujuh terduga pembawa sifat β -thalassemia dengan 2 daerah termutasi pada gen β -globin menunjukkan rerata MCV 61,16 fl, MCH 19,74 pg, and MCHC 32,3 g/gl. Satu individu terduga pembawa sifat β -thalassemia dengan 3 daerah termutasi pada gen β -globin menunjukkan rerata MCV 64,2 fl, MCH 19,5 pg, and MCHC 30,4 g/dl. Jumlah daerah termutasi bukan merupakan faktor utama penurunan indeks korpuskular pada pembawa sifat β -thalassemia.

Kata kunci: daerah termutasi, indeks korpuskular, pembawa sifat β -thalassemia

Abstract

Thalassemia is a genetic disorder caused by point mutation on the globin gene that decreasing the corpuscular index on thalasseman, included the carrier of thalassemia. Three to five percents of Indonesian is thalassemia carrier, β -thalassemia is the most common type. This research aimed to identify the relationship between the number of mutated region on β -globin gene and the decreasing of corpuscular index on β -thalassemia carrier. The data was collected during 2012 to 2013 in Yogyakarta. Hematological analysis was performed by corpuscular index included mean corpuscular volume (MCV), mean corpuscular haemoglobin (MCH), and mean corpuscular haemoglobin concentration (MCHC) in Prodia Laboratory. Molecular analysis was performed by the polymerase chain reaction-single stand conformation polymorphism (PCR-SSCP) method in Laboratory of Genetics and Laboratory of Falitma, Biology Faculty, University of Gadjah Mada. Of a total of 96 individual screeaned, there were 9 suspects β -thalassemia carrier with 1 β -globin gene mutated region showed the average of MCV 63,1 fl, MCH 19,76 pg and MCHC 32,34 g/dl. Seven suspects β -thalassemia carrier with 2 β -globin gene mutated regions showed the average of MCV 61,16 fl, MCH 19,74 pg, and MCHC 32,3 g/gl. One suspect β -thalassemia carrier with 3 β -globin gene mutated regions showed the average of MCV 64,2 fl, MCH 19,5 pg, and MCHC 30,4 g/dl. The number of β -globin gene mutated region was not the main factor of decreasing the corpuscular index on β -thalassemia carrier.

Keywords: mutated region, corpuscular index, β -thalassemia carrier

PENDAHULUAN

Darah merupakan jaringan pada hewan yang tersusun atas plasma dan sel darah (eritrosit, leukosit, dan trombosit) [1]. Salah satu fungsi darah adalah mengangkut oksigen dan karbondioksida dari dan ke jaringan, fungsi ini dilakukan oleh hemoglobin [2][3]. Kemampuan hemoglobin untuk mengikat oksigen dikarenakan adanya struktur empat molekul heme yang terikat pada rantai globin [4]. Pada orang dewasa, dapat dijumpai empat macam rantai globin, yaitu α , β , δ , dan γ . Kombinasi keempat macam rantai globin tersebut menyebabkan adanya tiga tipe hemoglobin, yaitu HbA ($\alpha_2\beta_2$), HbA₂ ($\alpha_2\delta_2$), dan HbF ($\alpha_2\gamma_2$) [3][5].

Apabila terjadi mutasi pada gen pengkode rantai globin, maka akan timbul kelainan fungsi hemoglobin atau bahkan kegagalan produksi hemoglobin. Kelainan yang disebabkan oleh mutasi gen pengkode rantai globin antara lain thalassemia dan Hb varian [6]. Thalassemia merupakan kelainan genetik dengan pola penurunan autosomal resesif yang banyak terjadi di daerah Afrika, Mediterania, Timur Tengah, Asia Selatan dan Asia Tenggara [7][8]. Thalassemia disebabkan oleh mutasi gen HBA atau HBB dan berdampak pada penurunan atau tidak adanya produksi rantai α -globin atau β -globin, sehingga dapat menyebabkan hemolisis dan gangguan eritropoiesis [3][9].

World Health Organization pada tahun 1994 menyatakan bahwa setidaknya terdapat 27×10^7 pembawa sifat thalassemia di dunia [10], sedangkan di Indonesia jumlah pembawa sifat thalassemia berkisar antara 3-5% dari total penduduk bahkan mencapai 10% pada daerah tertentu [11]. Kasus HbE dan β -thalassemia merupakan kasus tertinggi di Indonesia [12] termasuk di Palembang [13], Sumba Timur [12], Medan [14], dan Yogyakarta [15][16].

Upaya preventif dilakukan untuk mencegah pertambahan jumlah penyandang thalassemia adalah pemetaan jumlah pembawa sifat pada populasi melalui skrining [17]. Skrining dapat dilakukan secara massal di seluruh populasi atau secara parsial pada waktu tertentu, misalnya premarital atau prenatal. Beberapa metode dikembangkan untuk pelaksanaan skrining, antara lain, metode NESTROFT berdasarkan tingkat kerapuhan membran eritrosit [18], metode hematologis yang mengamati seluruh parameter eritrosit [8] hingga berbagai metode molekular yang dikembangkan untuk

menyempurnakan berbagai metode sebelumnya [19].

Yayasan Thalassemia Indonesia/Perhimpunan Orangtua Penderita Thalassemia Indonesia (YTI/POPTI) cabang Yogyakarta secara rutin melakukan skrining sejak tahun 2012. Skrining dilakukan dengan metode hematologis dan molekular. Salah satu parameter yang diamati dalam skrining hematologis adalah indeks korpuskular yang memberikan deskripsi kondisi rerata tiap eritrosit. Indeks korpuskular diukur melalui tiga hal, yaitu rerata volume eritrosit, rerata kandungan hemoglobin tiap satu eritrosit, dan rerata konsentrasi hemoglobin tiap satu eritrosit.

Analisis molekular dilakukan dengan metode *Polymerase Chain Reaction-Single Strand Conformation Polymorphism* (PCR-SSCP) yang telah divalidasi dengan sekuensing DNA. Analisis PCR-SSCP dilakukan pada empat daerah yang paling sering dijumpai adanya mutasi di dalamnya [20]. Berdasarkan analisis tersebut, ditemukan 17 individu pembawa sifat β -thalassemia dengan variasi jumlah daerah termutasi, yaitu satu hingga tiga daerah dari total empat daerah yang diamati [15]. Penelitian ini bertujuan mencari keterkaitan antara jumlah daerah termutasi pada gen pengkode β -globin dengan indeks korpuskular individu pembawa sifat β -thalassemia.

METODE PENELITIAN

Pengambilan Sampel

Sampel darah diperoleh dari 96 peserta skrining pembawa sifat thalassemia yang diselenggarakan oleh YTI/POPTI cabang Yogyakarta bekerja sama dengan laboratorium Prodia dan Fakultas Biologi Universitas Gadjah Mada tahun 2012-2013. Sebanyak 6 ml sampel darah masing-masing individu diambil dan disimpan dalam dua tabung vacutainer EDTA 3 ml. Satu tabung digunakan untuk analisis hematologi, sedangkan satu tabung digunakan untuk analisis molekular. Dalam proses penyimpanan dalam jangka waktu lama sampel darah dimasukkan dalam freezer -20°C.

Pengukuran Indeks Korpuskular

Pengukuran indeks korpuskular dilakukan di laboratorium Prodia Yogyakarta untuk mengukur parameter *mean corpuscular volume* (MCV), *mean corpuscular haemoglobin* (MCH), dan *mean corpuscular haemoglobin concentration* (MCHC).

Isolasi DNA

Isolasi DNA dilakukan berdasarkan manual kit isolasi *GeneAid Genomic DNA Mini Kit for Frozen Blood Protocol* dengan modifikasi, yang meliputi tahap lisis sel, pengikatan DNA pada kolom *silica gel*, pencucian, dan elusi DNA. Hasil isolasi DNA diuji kualitatif dengan elektroforesis gel agarosa 0,8 % dalam TBE 1x 100 volt selama 30 menit. Hasil elektroforesis direndam dalam *ethidium bromide* 30 menit dan dilihat dengan UV transiluminator.

Amplifikasi Gen β -Globin

Amplifikasi gen β -globin dilakukan pada empat daerah [20] pada mesin *thermocycler* (*Eppendorf Mastercycler Personal*) dengan menggunakan *PCR kit KAPA 2GTM Fast Ready Mix*. Amplifikasi gen β -globin dilakukan dengan campuran 12,5 μ l PCR *master mix*, 3 μ l DNA *template*, 1,25 μ l *forward primer*, 1,25 μ l *reverse primer* dan 7 μ l ddH₂O steril. Campuran diinkubasi dalam mesin *thermocycler* dengan kondisi suhu *pre-denaturation* 95°C selama 3 menit, 35 siklus (*denaturation* 95°C selama 15 detik, *annealing* sesuai *melting temperature* dari *primer* selama 30 detik, *elongation* 72°C selama 45 detik), *post-elongation* 72°C selama 5 menit dan *colling* 4°C selama 5 menit. Hasil amplifikasi gen β -globin diuji kualitatif dengan elektroforesis gel agarosa 1% dalam TBE 1x 50 volt 45 menit. Hasil elektroforesis direndam dalam *ethidium bromide* 30 menit dan dilihat dengan UV transiluminator.

Analisis molekular

Analisis molekular dilakukan dengan metode PCR-SSCP dan sekuensing DNA untuk uji validasi. PCR-SSCP dilakukan berdasarkan metode Fitriani dengan modifikasi [21]. Sebanyak 10 μ l produk PCR ditambah dengan 15 μ l *loading buffer* (campuran *bromo phenol blue*, *formamide*, EDTA, gliserol) diinkubasi dalam *waterbath* 95°C selama 10 menit, kemudian secepatnya dimasukkan dalam *freezer* -20°C selama 10 menit. Sebanyak 25 μ l campuran produk PCR dan *loading buffer* dimasukkan dalam *well* gel poliakrilamid (*acrylamide:bis-acrylamide* 29:1). Elektroforesis dilakukan pada 100 volt, 50 mA selama 100 menit dalam TBE 0,5x. Visualisasi hasil PCR-SSCP dilakukan dengan pewarnaan *ethidium bromide* yang diamati dengan UV transiluminator.

Sekuensing DNA dilakukan dengan mengirimkan sampel ke perusahaan 1st Base Singapura. Sampel yang dikirimkan berupa 30 μ l produk PCR, 20 μ l *primer* dengan konsentrasi 10 μ M, masing-masing komponen dimasukkan ke dalam tabung PCR berbeda. Setiap tabung PCR disegel dengan *parafilm* dan dimasukkan ke dalam wadah tertutup untuk dikirim ke Singapura melalui PT Genetika Science Jakarta.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Sebanyak 96 individu peserta skrining thalassemia YTI/POPTI Yogyakarta diambil sampel darahnya untuk dilakukan uji panel thalassemia. Pengujian dilakukan dengan melihat aspek hematologis dan aspek molekular. Tujuh belas individu dapat dideteksi memiliki paling tidak satu daerah termutasi pada gen pengkode β -globin dari total empat daerah yang diuji dengan metode PCR-SSCP yang divalidasi dengan sekuensing DNA. Enam dari 17 individu tersebut berjenis kelamin laki-laki, sedangkan sisanya perempuan.

Teknik PCR-SSCP merupakan teknik *PCR-based* yang dikembangkan agar mampu mengenali mutasi dan polimorfisme DNA. PCR-SSCP dapat mendeteksi adanya perubahan sekuens basa tunggal pada untai DNA melalui pengamatan di gel poliakrilamid. PCR-SSCP dimulai dengan memisahkan rantai ganda DNA menjadi rantai tunggal yang selanjutnya akan membentuk pola konformasi tertentu yang akan mempengaruhi pola migrasi di dalam gel poliakrilamid. Interpretasi data PCR-SSCP dilakukan dengan membandingkan pola migrasi individu pembawa sifat β -thalassemia dengan individu normal homozigot. Kebenaran hasil PCR-SSCP selanjutnya divalidasi dengan sekuensing DNA.

Tabel 1 menunjukkan perbandingan jumlah daerah termutasi pada gen pengkode β -globin dengan rerata indeks korpuskular individu. Sembilan individu pembawa sifat β -thalassemia dengan satu daerah termutasi memiliki rerata MCV 63,1fl, rerata MCH 19,76 pg, dan rerata MCHC 32,34 g/dl. Tujuh individu pembawa sifat β -thalassemia dengan dua daerah termutasi memiliki rerata MCV 61,16 fl, rerata MCH 19,74 pg, dan rerata MCHC 32,3 g/dl; sedangkan satu individu pembawa sifat β -thalassemia dengan tiga daerah termutasi memiliki rerata MCV 64,2 fl, rerata MCH 19,5 pg, dan rerata MCHC 30,4 g/dl.

Tabel 1. Perbandingan kondisi antara jumlah daerah termutasi pada gen pengkode β -globin dan rerata indeks korpuskular pembawa sifat β -thalassemia

JDT \ RIK	Jl	MCV (fL)	MCH (pg)	MCHC (g/dL)
1	9	63,1	19,76	32,34
2	7	61,16	19,74	32,3
3	1	64,2	19,5	30,4

Keterangan:

JDT : Jumlah daerah termutasi

Jl : Jumlah individu

RIK : Rerata Indeks korpuskular

MCV : *mean corpuscular volume*

MCH : *mean corpuscular haemoglobin*

MCHC : *mean corpuscular haemoglobin concentration*

Rantai β -globin dikode oleh gen HBB yang terdapat dalam kromosom nomor 11. Rantai β -globin disintesis tubuh sejak fase embrional, namun berdeda proporsi produksinya tiap fase perkembangan. Sintesis rantai β -globin akan meningkat saat usia kandungan melewati masa 36 minggu dan akan semakin meningkat saat kelahiran dan akan mulai konstan saat usia 30 minggu. Peningkatan sintesis β -globin ini diikuti oleh penurunan sintesis rantai δ -globin, sehingga dalam kondisi normal, persentase hemoglobin tipe HbA ($\alpha_2\beta_2$) pada orang dewasa jauh lebih tinggi daripada tipe hemoglobin yang lain.

Mutasi gen HBB dapat menyebabkan penurunan atau tidak adanya produksi rantai β -globin yang dapat berdampak pada kelainan atau bahkan kegagalan fungsi hemoglobin untuk mengikat oksigen, serta dapat berdampak pada perubahan struktur β -globin dan berkurangnya umur eritrosit. Secara fenotip, mutasi gen HBB dapat berakibat pada penurunan indeks korpuskular seseorang. Indeks korpuskular merupakan kondisi rerata setiap eritrosit. Indeks korpuskular diukur pada tiga macam parameter, yaitu volume rerata tiap eritrosit (MCV), rerata kandungan hemoglobin dalam satu eritrosit (MCH) dan rerata konsentrasi hemoglobin dalam satu eritrosit (MCHC). Nilai ketiga macam parameter ini bersifat konstan dan tidak terpengaruh atas jenis nutrisi yang dikonsumsi seseorang, sehingga dapat dijadikan salah satu indikator yang valid untuk mengetahui status seseorang atas kelainan thalassemia.

Pengukuran parameter *mean corpuscular volume* (MCV) memberikan informasi terkait volume rata-rata eritrosit. Secara manual, MCV dapat dihitung dengan membandingkan nilai hematokrit dengan jumlah eritrosit. Rentang MCV normal untuk anak-anak adalah 69-93 fl, sedangkan untuk orang dewasa adalah 80-100 fL. Secara mikroskopis, hasil pengukuran MCV dapat dibandingkan dengan kondisi ukuran eritrosit pada gambaran darah tepi. Dalam kondisi normal, eritrosit seukuran dengan limfosit, sehingga jika dijumpai adanya eritrosit yang berukuran lebih kecil daripada limfosit, maka disebut dengan kondisi mikrositik, kondisi sebaliknya adalah makrositik.

Thalassemia terjadi akibat adanya mutasi yang menyebabkan adanya penurunan atau kegagalan produksi rantai globin, sehingga dari adanya penurunan parameter MCV. Tabel 1 menunjukkan bahwa seluruh rerata MCV berada di bawah batas nilai MCV normal, bahkan di bawah batas normal pada kondisi normal anak-anak. Hasil pada MCV tidak menunjukkan adanya kecenderungan makin banyak jumlah daerah termutasi akan makin menurunkan rerata MCV.

Parameter pengukuran kedua adalah MCH yang menunjukkan rerata kandungan hemoglobin dalam setiap eritrosit. Parameter MCH berbeda dengan parameter hemoglobin pada kategori hitung darah rutin (*cell blood count*). Hasil pengukuran terhadap MCH akan konstan, sedangkan hasil pengukuran terhadap hemoglobin seseorang akan fluktuatif berdasarkan kondisi fisiologis orang tersebut. Secara manual, parameter MCH dapat dihitung dengan membandingkan konsentrasi hemoglobin dengan jumlah eritrosit. MCH orang dewasa normal berada di kisaran 26 – 34 pg, sedangkan untuk anak-anak berada pada kisaran 23 – 31 pg. Pada pengamatan mikroskopis, jika nilai MCH rendah, dapat teramati pada kondisi warna eritrosit yang pudar/pucat. Kondisi ini disebut hipokromik yang merupakan salah satu indikator thalassemia, baik mayor, intermedia, maupun minor.

Tabel 1 menunjukkan adanya kecenderungan antara peningkatan jumlah daerah termutasi pada gen pengkode β -globin menyebabkan penurunan rerata nilai MCH. Kecenderungan yang sama juga teramati pada parameter MCHC. Parameter MCHC mengukur rerata konsentrasi hemoglobin pada setiap eritrosit. Nilai MCHC dapat dihitung secara manual dengan

membandingkan konsentrasi hemoglobin dengan nilai hematokrit. MCHC bukan merupakan indikator mutlak dalam penentuan status seseorang terkait thalassemia, namun dapat dijadikan sebagai pelengkap pertimbangan. Kisaran nilai MCHC normal adalah 32 – 36 g/dL. Tabel 1 menunjukkan bahwa peningkatan jumlah daerah termutasi pada gen pengkode β -globin diiringi dengan penurunan rerata nilai MCHC. Pada individu dengan satu dan dua daerah termutasi pada gen pengkode β -globin, rerata nilai MCHC masih dalam kisaran normal, sedangkan individu dengan tiga daerah termutasi pada gen pengkode β -globin menunjukkan rerata nilai MCHC di bawah kisaran normal.

Di Asia Tenggara telah ditemukan lebih dari 66 jenis mutasi penyebab β -thalassemia. Berbagai macam mutasi ini tidak memberikan dampak yang seragam. Sebagian dari jenis mutasi merupakan *silent mutation* yang tidak menyebabkan perubahan protein yang dihasilkan dari proses ekspresi gen, sehingga tidak menimbulkan dampak yang parah bagi penderita. Beberapa jenis mutasi yang lain merupakan *missense mutation* yang menyebabkan perubahan jenis protein yang dihasilkan, bahkan sebagian jenis mutasi berupa delesi dapat mengakibatkan pergeseran rangka baca pada saat ekspresi gen. Keberagaman jenis mutasi yang ada lebih diyakini mempunyai keterkaitan yang lebih erat dengan penurunan indeks korpuskular, baik MCV, MCH maupun MCHC.

Silent mutation gen HBB pengkode β -globin sangat beragam. Gen sepanjang 1,6kb ini memiliki 3 *exon* dan 2 *intervening sequence*. Mutasi gen HBB tidak hanya terjadi pada daerah *exon* yang akan diekspresikan menjadi protein, namun dapat terjadi pula pada *promoter*, *untranslated region* (UTR), dan *intervening sequence* yang merupakan tidak menyebabkan perubahan protein. Mutasi -92 C>T pada CACC *box* merupakan contoh *silent mutation* pada daerah *promoter*. Pada daerah UTR juga terdapat beberapa contoh *silent mutation*, misalnya mutasi +1 A>C dan +6 C>G. Keberagaman *silent mutation* ini makin memperkuat asumsi bahwa jumlah daerah termutasi bukan merupakan penyebab utama penurunan indeks korpuskular.

Indikator jumlah daerah termutasi pada gen pengkode β -globin bersifat komplementer

dengan jenis mutasi yang terjadi di dalamnya. Makin banyak jenis mutasi yang terjadi tidak akan memberikan dampak signifikan jika jenis mutasi yang terjadi adalah *silent mutation*. Namun, jumlah daerah termutasi juga memberikan andil dalam penurunan nilai indeks korpuskular. Dua daerah termutasi berjenis *missense mutation* akan memberikan dampak yang lebih parah daripada kondisi satu daerah termutasi berjenis *missense mutation*.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih penulis ucapkan kepada Dr. Niken Satuti Nurhandayani, M.Sc., Laboratorium Genetika Fakultas Biologi Universitas Gadjh Mada atas dukungan finansial, moral dan bimbingan intensif atas penelitian ini.

SIMPULAN

Jumlah daerah termutasi pada gen pengkode rantai β -globin bukan merupakan faktor utama penurunan indeks korpuskular pada individu pembawa sifat β -thalassemia.

DAFTAR PUSTAKA

- [1] Silbernagl, S. & Despopoulos, A. 2009. *Color Atlas of Physiology*. 6th ed. Thieme, Stuttgart, Germany, pp: 88-90.
- [2] Favero, M.E. & Costa, F.F. 2011. Alpha-haemoglobin-stabilizing Protein: an Erythroid Molecular Chaperone. *Biochem. Int.* 2011: 1-7.
- [3] Tangvarasittichai, S. 2011. *Thalassemia Syndrome, Advances in the Study of Genetic Disorders*. InTech (versi online). (<http://www.intechopen.com/books/advances-in-the-study-of-genetic-disorders/thalassemia-syndrome>)
- [4] Clarke, G.M. & Higgins, T.N. 2000. Laboratory Investigation of Haemoglobinopathies and Thalassaemias: Review and Update. *Clin. Chem.* 46 (8B): 1284-1290
- [5] Mosca, A., Paleari, R., Ivaldi, G., Galanello, R., & Giordano, P.C. 2009. The Role of Haemoglobin A Testing in the Diagnosis of Thalassaemias and Related Haemoglobinopathies. *J. Clin. Pathol.* 62: 13-17.
- [6] Rogers, K. 2011. *Blood: Physiology and Circulation*, 1st ed. Britannica Educational Publishing, New York.
- [7] Hoffbrand, A.V., Pettit, J.E., Moss, P.A.H. 2006. *Essential Haematology Fifth Edition*. Massachusetts: Blackwell Science, Inc.

- [8] Cao, A. & Galanello, R. 2010. Beta-thalassemia. *GeneTest Review. Genetics in Medicine* 12:2.
- [9] Galanello, R. 2012. Recent Advances in the Molecular Understanding of NonTransfusion-Dependent Thalassemia. *Blood Rev.* 26S: S7-S11.
- [10] Weatherall, D.J. & Clegg, J.B. 2001. Inherited Haemoglobin Disorders: An Increasing Global Health Problem. Public Health Reviews. *Bulletin of the World Health Organization* 79: 704-712.
- [11] Anonymous. 2010. *Pencegahan Thalassemia (Hasil Kajian HTA Tahun 2009)*. Dirjen Bina Pelayanan Medik, Kementerian Kesehatan Republik Indonesia, Jakarta.
- [12] Lanni, F. 2002. Heterogenitas Molekular Gena Globin- β di Indonesia: Kaitannya dengan Pola Penyebaran Thalassemia- β serta Afinitas Genetik antar Populasi di Indonesia. *Disertasi*, tidak diterbitkan. UGM. Yogyakarta.
- [13] Sofro, A.S.M., Clegg, J.B., Lanni, F., Sianipar, O., Himawan, & Liliani, R.V. 1996. Application of ARMS Primers for the Molecular Characterization of β -Thalassemia Carrier in Palembang, South Sumatra. *I. J. Biotech.* 12: 5965.
- [14] Ganie, R.A. 2008. Distribusi Pembawa Sifat Thalassemia (α & β) dan Hemoglobin-E pada Penduduk Medan. *Majalah Kedokteran Nusantara* 41 (2): 117-122.
- [15] Priyambodo. 2014. Deteksi Molekular Pembawa Sifat β -thalassemia di Daerah Istimewa Yogyakarta. *Tesis*, tidak diterbitkan. UGM. Yogyakarta
- [16] Magfirahtul Jannah. 2014. Profil Hematologis dan Deteksi Molekular Pembawa Sifat Hemoglobin E di Yogyakarta. *Tesis*, tidak diterbitkan. UGM. Yogyakarta
- [17] Modell, B. & Darlison, M. 2008. Global Epidemiology of Haemoglobin Disorders and Derived Service Indicators. *Bulletin of the World Health Organization* 86 (6): 417-496.
- [18] Mangiani, M., Lokeshwar, M.R., Vani, VG., Bhatia, N. & Mhaskar, V. 1997. NESTROFT, an Effective Screening Test for Beta Thalassemia Trait. *Indian Pediatrics* 34: 702-707.
- [19] Calzolari, Roberta, McMorro, Tara, Yannoutsos, Nikos, Langeveld, An, Grosveld, Frank. 1999. Deletion of a Region that is a Candidate for the Difference between the Deletion Forms of Hereditary Persistence of Fetal Hemoglobin and $\delta\beta$ -thalassemia Affets β - bbut not γ -Globin Gene Expression. *European Molecular Biology Organization.* 18: 4 pp 949 – 958.
- [20] Gupta, A. & Agarwal, S. 2003. Efficiency and Cost Effectiveness: PAGE-SSCP versus MDE and Phast gels for Identification of Unknown β -Thalassaemia Mutations. *Journal of Clinical Pathology*, 56: 237-239.
- [21] Fitriani, I. 2009. Deteksi Mutasi Gen MATP pada Penderita Oculocutaneous Albinism (OCA) di DIY dan Wonosobo (Jawa Tengah). *Tesis*. tidak diterbitkan. UGM. Yogyakarta.