

# Uji Diagnostik Indeks Darah dan Identifikasi Molekuler Karier Talasemia $\beta$ pada Pendorong Darah di Banyumas

## *Diagnostic Test of Blood Index and Molecular Identification of $\beta$ Thalassemia Carrier among Blood Donor Subjects in Banyumas*

Ariadne Tiara Hapsari<sup>1</sup>, Lantip Rujito<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Departemen Ilmu Kesehatan Anak Rumah Sakit Margono Soekardjo Purwokerto

<sup>2</sup>Laboratorium Riset Biologi Molekuler Fakultas Kedokteran dan Ilmu Ilmu Kesehatan Universitas Jenderal Soedirman Purwokerto

### ABSTRACT

Talasemia menempati kelainan genetik yang paling umum di seluruh dunia dengan prevalensi karier talasemia di Indonesia adalah sekitar 3-10%. Banyumas merupakan salah satu wilayah yang menyumbang angka prevalensi penderita talasemia yang cukup besar. Salah satu perangkat dalam program pencegahan terpadu adalah memastikan diagnosa molekuler pada tahap skrining sesuai dengan mutasi lokal. Tujuan dari penelitian adalah untuk mengetahui nilai uji diagnostik indeks darah dan karakteristik mutasi talasemia  $\beta$  pada pendonor darah yang dicurigai karier talasemia. Subjek penelitian adalah 183 pendonor darah rutin pada PMI Banyumas. Skrining awal menggunakan indeks darah MCV, MCH, dan Hemoglobin elektroforesis. Karakteristik molekuler dilakukan dengan teknik PCR-RFLP dan teknik ARMS. Hasil penelitian menunjukkan bahwa MCV memiliki nilai sensitivitas 81,3%, dan spesifisitas 95,8% sedangkan MCH menunjukkan sensitivitas sebesar 80% dengan spesifisitas 97,5%. Mutasi IVS-1 nt 5 (G>C) merupakan mutasi tersering disusul dengan HBE (codon 26) dan IVS1 nt 1 (G>T).

**Kata Kunci:** Identifikasi molekuler, indeks darah, karier talasemia

### ABSTRACT

*Thalassemia occupies the most common genetic disorder worldwide. Prevalence of thalassemia carrier in Indonesia is around 3-10%. Banyumas is one of several areas that accounts for high prevalence of thalassemia patients. One of the tools in an integrated prevention program is to ensure the molecular diagnosis at screening stage is in accordance with the local mutation. The aim of the study is to find out the value of diagnostic testing of blood and characteristic index  $\beta$  thalassemia mutations in blood donors suspected as thalassemia carrier. The research subjects were 183 regular blood donors at Red Cross Banyumas. The initial screening used MCV blood index, MCH, and Hemoglobin electrophoresis. Molecular characteristics were performed using PCR-RFLP and ARMS techniques. The results show that MCV has a sensitivity value of 81,3% and specificity 95,8% while MCH shows a sensitivity of 80% with specificity 97,5%. Mutation IVS-1 nt 5 (G>C) is the most frequent mutation followed by HBE (codon 26) and IVS1 nt 1 (G>T).*

**Keywords:** Blood index, molecular identification, thalassemia carrier

---

*Jurnal Kedokteran Brawijaya, Vol. 28, No. 3, Februari 2015; Korespondensi: Lantip Rujito. Laboratorium Riset Biologi Molekuler, Fakultas Kedokteran dan Ilmu Ilmu Kesehatan Universitas Jenderal Soedirman Purwokerto, Jl. Gumbreg No. 1, Purwokerto 53146 Tel. (0281) 622022 Fax. (0281) 624990 Email: l.rujito@unsoed.ac.id*

## PENDAHULUAN

Talasemia diartikan sebagai sekumpulan gangguan genetik yang mengakibatkan berkurang atau tidak ada sama sekali sintesis satu atau lebih rantai globin. Talasemia menempati kelainan genetik yang paling umum di seluruh dunia. Sebanyak 4,83% dari populasi dunia membawa globin varian, termasuk didalamnya 1,67 persen populasi yang *heterozygous* untuk  $\alpha$  talasemia dan  $\beta$  talasemia (1). Prevalensi talasemia di Indonesia sekitar 3-10% (2). Data menunjukkan bahwa dari 250 ribu populasi penduduk ditemukan sekitar 2.500 kasus baru setiap tahunnya. Saat ini terdapat kira-kira 5.000 pasien yang masih hidup. Sebanyak 2.500-3.000 pasien tersebut lahir di Indonesia. Data ini menunjukkan penderita talasemia sebelum umur 6 tahun sudah banyak yang meninggal di rumah (3).

Banyumas adalah daerah dengan pertambahan penderita talasemia yang cukup pesat dengan jumlah penderita melebihi angka 250. Data menunjukkan penambahan kasus adalah 3-7 penderita pertahun atau penderita tiap tahunnya atau 4,76 % -11,50% tiap tahunnya dari jumlah kasus sebelumnya (4). Karakteristik wilayah menunjukkan masih banyak daerah terisolir dengan banyak daerah pegunungan. Beberapa penderita menunjukkan kedekatan keluarga satu sama lain serta adanya satu keluarga dengan beberapa anak talasemia.

Saat ini program pencegahan sedang digalakkan oleh Pusat Kajian Talasemia Banyumas bekerjasama dengan Palang Merah Indonesia (PMI), Yayasan Talasemia Indonesia (YTI), Universitas Jenderal Soedirman (UNSOED), dan Pemerintah Daerah. Salah satu perangkat dalam program pencegahan terpadu adalah memastikan uji penyaring yang efektif berdasarkan presentasi lokal. Uji hematologis dengan indeks darah berupa *mean corpuscular volume* (MCV) dan *mean corpuscular hemoglobin* (MCH) selama ini masih menjadi ujung tombak skema penyaringan. Meskipun demikian data diberbagai daerah dapat menunjukkan nilai *cut off point* yang berbeda. Beberapa tempat di Eropa nilai MCV  $\leq 70$ fl dan MCH  $\leq 25$ pg menjadi dasar pada daerah nilai yang di anut (5). Dengan menggunakan nilai sejenis, pada daerah lainnya dapat meloloskan pembawa sifat talasemia  $\beta$  (6). Di Indonesia sendiri kajian *Health Technology Assesment* (HTA) merekomendasikan MCV  $\leq 80$  fl dan MCH  $\leq 27$  pg serta nilai HbA<sub>2</sub>  $\geq 3,5\%$  sebagai perangkat skrining (7). Pemeriksaan yang sesuai dengan nilai indeks hematologis lokal dapat menyaring pembawa sifat dengan hemat, sebelum dilanjutkan dengan pemeriksaan hemoglobin elektroforesis yang jauh lebih mahal.

Untuk menilai paramater hematologis lokal sebagai nilai skrining lokal perlu dilakukan kajian terkait dengan dengan hal tersebut. Selain itu saat ini mutasi yang terjadi pada gen globin  $\beta$  dan  $\alpha$  tercatat lebih dari 200 jenis mutasi (8). Namun demikian, terdapat kecenderungan etnis dan geografi yang berbeda pada jenis-jenis mutasi tersebut. Pengetahuan tentang aspek molekuler sesuai dengan etnik lokal pada perangkat uji skrining sangat penting untuk konseling genetik pada keluarga serta diharapkan protokol pencegahan dapat dilaksanakan secara efektif dan efisien.

Selain fakta tersebut, secara umum pembawa sifat atau karier talasemia tidak akan menunjukkan gejala klinis dan dapat hidup layaknya individu normal (9). Data ini menunjukkan bahwa para pendonor darah tersebut dapat sekaligus sebagai karier untuk talasemia. Pembawa sifat

yang secara rutin mendonorkan darahnya dapat mengganggu sistem eritropoiesis yang dapat berakibat sistemik. Untuk itu pemeriksaan uji skrining pada para pendonor menjadi penting. Berdasarkan latar belakang tersebut dilakukan penelitian ini untuk mengetahui nilai uji diagnosis indeks hematologis, prevalensi karier talasemia, serta mengetahui mutasi talasemia  $\beta$  pada pendonor darah di Banyumas.

## METODE

Penelitian menggunakan studi *cross sectional* dengan subjek yang mengikuti skrining talasemia menggunakan perangkat nilai hematologis sebanyak 183 subjek diseluruh wilayah Banyumas. Sampel diambil menggunakan proporsional random sampling yang mewakili semua wilayah di Banyumas. Pemeriksaan indeks hematologis dan hemoglobin elektroforesis dilakukan di Laboratorium Klinik RS Margono Soekardjo Purwokerto. Isolasi dan DNA dilakukan di Laboratorium Riset Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan (FKIK) Universitas Jenderal Soedirman (Unsoed) dan Laboratorium Riset Terpadu Unsoed. Nilai indeks hematologis yang diukur dalam penelitian ini adalah Hb dalam satuan g/dl, MCV dalam satuan fl, MCH dalam satuan pg. Nilai indeks hematologis diukur menggunakan automatic machine XP 2000. Kecurigaan karier talasemia ditentukan dengan rujukan MCV  $<80$ fL, MCH  $<27$ pg dan HbA<sub>2</sub>  $>3,5\%$ . Jenis mutasi pada gena globin  $\beta$  sesuai dengan *data base* yang terdapat di *A Database of Human Hemoglobin Variants and Talasemias* (<http://globin.bx.psu.edu/hbvar/menu.html>). Identifikasi mutasi menggunakan teknik ARMS sesuai dengan yang dijelaskan pada referensi rujukan (10,11).

## HASIL

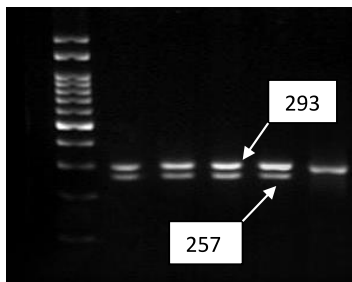
Sebanyak 183 pendonor, seluruhnya merupakan pendonor darah tidak rutin, didominasi oleh pria yang jumlahnya mencapai 147 orang (82%). Sebanyak 22 sampel dari jumlah subjek memiliki nilai MCV  $<80$ fL, MCH  $<27$ pg dan HbA<sub>2</sub>  $>3,5\%$ . Karakteristik indeks darah dari subjek tersebut disajikan pada Tabel 1. Hasil pemeriksaan laboratorium menunjukkan bahwa secara umum kelompok yang dicurigai karier *talassaemia- $\beta$*  memiliki nilai rerata Hb, MCV, MCH, dan HbA yang lebih rendah dari kelompok pendonor normal dan kelompok karier memiliki nilai indeks HbA<sub>2</sub> dan HbF yang lebih tinggi dari kelompok normal. Beberapa individu memiliki gambaran klasik karier talasemia  $\beta$  dengan HbA<sub>2</sub>  $\geq 3,5$  (12).

**Tabel 1. Perbandingan nilai index darah karier talasemia dan normal**

Index Darah	Nilai Mean dan Standard Deviasi		T test (p value)
	Karier Talasemia	Normal Proband	
HB	13 ( $\pm 1,82$ )	13,6 ( $\pm 1,56$ )	0,89
MVC	77,2 ( $\pm 5,67$ )	87,7 ( $\pm 3,68$ )	0,021
MCH	24,7 ( $\pm 2,3$ )	29,8 ( $\pm 1,5$ )	0,008
HbA <sub>2</sub>	4,6 ( $\pm 1,1$ )	2,8 ( $\pm 0,23$ )	0,00
HbF	4,3 ( $\pm 10,13$ )	0,16 ( $\pm 0,39$ )	0,003

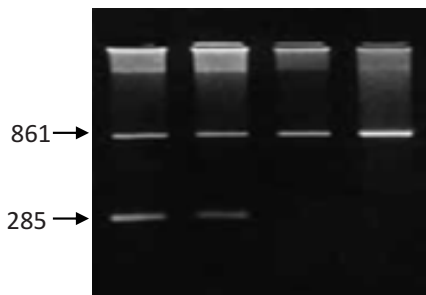
Indeks darah pada kelompok karier menunjukkan konsistensi terhadap kriteria umum. Untuk nilai HbA<sub>2</sub>

pada beberapa individu dengan nilai MCV dan MCH yang rendah memiliki nilai <3,5%. Gambaran nilai MCV dan atau MCH yang rendah akan tetapi HbA2 normal, menunjukkan bahwa individu tersebut dapat dicurigai sebagai pembawa sifat talasemia  $\alpha$  (13).



**Gambar 1. Pemeriksaan DNA IVS1 nt 5 dengan teknik PCR-RFLP**

**Keterangan:** Alel normal memiliki 293 bp, dan alel IVS1-5 memiliki 257 dan 36 bp



**Gambar 2. Hasil ARMS mutasi IVS1-5.**

**Keterangan:** Pita muncul dengan produk 285bp menunjukkan mutasi IVS1-5, pita 861bp merupakan kontrol primer

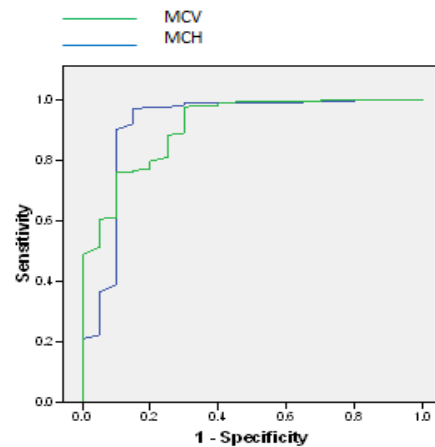
Pemeriksaan DNA adalah kelanjutan setelah melalui pemeriksaan penunjang awal, mulai dari pemeriksaan indeks darah dan Hb elektroforesis (14). Pemeriksaan DNA menggunakan teknik ARMS memiliki keunggulan cepat, murah, dan dapat dikerjakan serentak. Pemeriksaan tersebut memiliki keterbatasan, tidak semua jenis alel dapat diperiksa dengan metode ARMS (11). Selain itu pemeriksaan dapat juga dilakukan dengan teknik PCR-RFLP dengan menggunakan enzim yang dapat mengenali perubahan basa di alel yang dikehendaki. Hasil pemeriksaan DNA dengan dua metode tersebut disajikan pada Gambar 1 dan 2.

Tabel 2 menyajikan pemeriksaan terhadap 183 probandus secara lengkap. Hasil menunjukkan mutasi karier talasemia di Banyumas sebesar 8,74%. Terdapat tiga macam mutasi yaitu IVS1-nt5 (G>C), IVS1-nt1 (G>T), dan CD26 (G>C) (HBE), dengan mutasi terbanyak adalah IVS1-nt5 (G>C).

**Tabel 2. Jenis mutasi karier talasemia di Banyumas**

Jenis Mutasi	Prosentase
IVS1-nt5 (G>C)	6,04%
IVS1-nt1 (G>T)	0,5%
CD26 (G>C) (HBE)	2,20%

Skrining menggunakan parameter indeks darah MCV dan MCH menunjukkan bahwa sensitivitas MCV dengan *cut off point* <80fl adalah 81,3%, spesifisitasnya adalah 95,8%. Pemeriksaan MCH pg dengan *cut off point* <27 menunjukkan sensitivitas sebesar 80% dengan spesifisitas 97,5%. Untuk mengetahui *cut off point* MCV dan MCH dari nilai asli dilakukan analisis kurva ROC. Dengan menggunakan kurva ROC dapat diketahui bahwa nilai terbaik dari masing masing parameter adalah MCV: 84fl dengan sensitivitas 77%, spesifisitas 85% dan area di bawah kurva (UCA): 91,2%. MCH mempunyai nilai yang tidak jauh berbeda dengan MCV yaitu; MCH: 27,06fl dengan sensitivitas 96%, spesifisitas 85% dengan area di bawah kurva 91,6%.



**Gambar 3. Kurva ROC MCV dan MCH terhadap gold standar DNA**

**Keterangan:** Nilai undercurve area MCV sebesar 91,2 % untuk point 84 fl, dan MCH sebesar 91,6 % untuk point 27,06 pg

**DISKUSI**

Pemeriksaan skrining untuk mengetahui pembawa sifat talasemia merupakan bagian integral dari upaya pencegahan di suatu wilayah. Perekaman data primer tentang epidemiologi karier talasemia di suatu tempat menjadi langkah awal yang harus dilakukan instansi yang terlibat dalam upaya pencegahan tersebut. Pengetahuan tentang prevalensi talasemia dan juga hemoglobinopati tersebut dapat digunakan untuk merumuskan langkah strategis sesuai dengan temaun karakteristik karier di daerah tersebut.

Penelitian ini merupakan bagian dari tahapan dalam kerangka pencegahan penyakit talasemia yang sedang digalakan oleh Tim Peneliti Talasemia di Banyumas. Data menunjukkan bahwa pembawa sifat atau karier talasemia di Banyumas adalah 8%. Angka ini termasuk dalam kelas yang tinggi jika dibandingkan rata-rata pembawa sifat talasemia di Indonesia yang sebesar 3-10% (2).

Penentuan panel pembawa sifat didasarkan pada pemeriksaan hematologis yang paling sederhana berupa apusan darah, berlanjut ke pemeriksaan indeks hematologis, penentuan fraksi hemoglobin, dan sebagai *gold standard* adalah pemeriksaan DNA. Penilaian MCV dan MCH sebagai nilai indeks darah yang digunakan, mempunyai nilai yang bervariasi antar negara. Indonesia mengacu pada protokol ICHS yang memberlakukan nilai

indeks darah MCV < 80 fl, dan MCH < 27 pg untuk menyaring pembawa sifat talasemia. Beberapa negara menggunakan parameter yang berbeda terutama MCV seperti di Sardinia menggunakan batasan < 78 fl, dan Hongkong dengan batasan MCV < 75 fl (6). Penelitian Weatherall bahkan merekomendasikan nilai MCV < 70 fl sebagai kriteria skrining karier di Sardinia (5).

Kelompok karier talasemia- $\beta$  memiliki nilai rerata Hb sebesar 13 g/dL, sedangkan kelompok normal memiliki nilai rerata Hb yang lebih tinggi, yaitu sebesar 13,6 g/dL. Secara umum hasil ini sesuai dengan penelitian terdahulu yang menyatakan bahwa secara statistik tidak menunjukkan perbedaan signifikan antar kelompok normal dan kelompok karier (9,15). Walaupun demikian, kadar Hb rata-rata pada karier talasemia sedikit lebih rendah dari pada individu normal (8,16).

Parameter indeks darah dalam penelitian ini menunjukkan bahwa dengan *cut off point* MCV < 80 fl ditemukan nilai sensitivitas 81,3%, dan spesifisitasnya adalah 95,8%. Sebaliknya MCH pg dengan *cut off point* < 27 menunjukkan sensitivitas sebesar 80% dengan spesifisitas 97,5%. Nilai diagnosis dari parameter ini menunjukkan kualitas yang baik dengan nilai di atas 80%. Indeks darah telah digunakan secara luas dalam penentuan skrining pembawa sifat talasemia di seluruh dunia. Dengan menggunakan parameter indeks darah ini artinya dari 100 orang dengan karier talasemia akan dapat disaring kurang lebih 80 orang. Tingkat spesifisitas yang tinggi juga menunjukkan kekuatan nilai diagnosis dari parameter ini untuk menyingkirkan diagnosis selain talasemia.

Perbedaan variasi dari nilai indeks MCV dan MCH disebabkan oleh perbedaan variasi berat dan ringannya jenis mutasi talasemia yang ditemukan di setiap bagian (9). Beberapa mutasi bersifat khas untuk daerah tersebut sedangkan mutasi lain terjadi di negara lain. Untuk daerah dengan jenis mutasi talasemia  $\beta$  umumnya menunjukkan nilai MVC dan MCH yang sangat rendah, kurang dari 70 fl, dan 25 pg sehingga beberapa negara menggunakan parameter < 70 fl dan < 25 pg (17).

Indonesia dengan tingkat variasi mutasi HbE dan IVS1, maka dengan nilai parameter yang rendah ini akan menurunkan nilai sensitivitas dan spesifisitas dari indeks hematologis ini. Untuk itu keputusan untuk mengambil nilai < 80 fl dan < 27 pg sesuai dengan kondisi mutasi di Indonesia (7). Hal ini juga diperkuat dengan penelitian ini bahwa dengan nilai indeks tersebut mempunyai nilai diagnostik yang sangat baik.

Parameter HbA<sub>2</sub> menjadi tolak ukur penyaring kedua untuk mendeteksi pembawa sifat talasemia. Penelitian-

penelitian menunjukkan bahwa nilai HbA<sub>2</sub>  $\geq$  3,5 memberikan nilai diagnostik yang paling baik untuk menentukan pembawa sifat talasemia  $\beta$  (1,18). Pada penelitian ini diketahui bahwa dengan parameter HbA<sub>2</sub>  $\geq$  3,5% sensitivitasnya mencapai 93,5% untuk deteksi talasemia  $\beta$ . HbA<sub>2</sub> memiliki nilai sensitivitas dan spesifisitas yang baik sebagai alat diagnostik skrining *carrier* talasemia  $\beta$  (19), namun beberapa peneliti menyarankan untuk tidak menggunakan HbA<sub>2</sub> sebagai marker tunggal. Kombinasi nilai MCV, MCH dan HbA<sub>2</sub> sangat direkomendasikan sebagai marker awal deteksi dini *carrier* Talasemia  $\beta$  (1,20).

Pemeriksaan HbA<sub>2</sub> menjadi sangat penting dalam tahapan skrining pembawa sifat talasemia. Pemakaian parameter ini dapat menyaring probandus yang lolos dalam pemeriksaan indeks darah MCV dan MCH. Pada beberapa penelitian disebutkan bahwa probandus dengan MCV dan MCH yang rendah dapat menunjukkan nilai HbA<sub>2</sub> yang normal. Pada kasus-kasus tersebut dimungkinkan probandus yang diperiksa tersebut adalah pembawa talasemia  $\alpha$  (9). Beberapa kasus lain menunjukkan parameter HbA<sub>2</sub>  $\geq$  3,5% tetapi dengan indeks darah yang normal. Keadaan tersebut dapat terjadi pada kasus pembawa sifat talasemia yang baru saja mendapat transfusi akibat penyakit atau keadaan lainnya (21).

Jenis mutasi yang ditemukan pada penelitian ini tidak jauh berbeda dengan penemuan terhadap etnis Jawa lainnya. Mutasi IVS1 nt 5 (G<C) merupakan jenis mutasi yang terbanyak ditemukan, kemudian berturut-turut adalah IVS1 nt 1 (G<T) dan HBE (kodon 26). Temuan ini masih sesuai dengan penelitian Iswari dkk yang menyatakan bahwa untuk etnis Jawa di dominasi oleh mutasi IVS 1 nt % (G<C) (22). Jenis lain yang merupakan jenis mutasi yang cukup sering ditemukan di etnis Jawa namun tidak ditemukan pada penelitian ini adalah jenis mutasi CD -35. Penemuan ini menunjukkan bahwa daerah Banyumas masih tergolong daerah dengan isolasi perkawinan yang cukup kuat. Tidak ditemukannya mutasi lain menunjukkan tingkat mobilitas dan *cross breeding* di daerah ini masih sangat kecil. Dari kajian ini dapat disimpulkan bahwa sensitivitas dan spesifisitas indeks darah MCV dan MCH dapat dipakai sebagai perangkat awal skrining diagnosa karier talasemia. Prevalensi karier talasemia  $\beta$  pada pendonor darah di Banyumas adalah 8% mutasi IVS1 nt5 sebagai jenis mutasi yang paling banyak ditemukan.

#### UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis menyampaikan terima kasih kepada *Health Professional Education Quality (HPEQ) Project* Unsoed atas pendanaan penelitian ini.

#### DAFTAR PUSTAKA

1. Weatherall DJ. *Thalassemi as a Global Health Problem: Recent Progress Toward its Control in the Developing Countries*. Annals of the New York Academy of Sciences. 2010; 1202(1): 17-23.
2. Sofro AS. *Molecular Pathology of Beta-Talasemia in Indonesia*. The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health. 1995; 26 (Suppl1): 221-224.
3. Lanni F, Gani RA, Widuri, Rochdiyati W, Verawaty B, Sukmawati, dkk.  *$\beta$ -Thalassemi and Hemoglobin-E traits in Yogyakarta Population*. Dipresentasikan pada 11th International Conference on Thalassaemia and Haemoglobinopathies & 13rd International TIF Conference for Thalassaemia Patients and Parents. Singapore; 8-11 Oktober 2008
4. Rujito L, Setyono J, dan Siswandari W. *Data Penelitian Project Riset Unggulan Unsoed (RUKU) 2012*. [Laporan]. Universitas Jenderal Soedirman, Purwokerto. 2012.
5. Weatherall DJ. *Fortnightly Review: The Thalassaemias*. British Medical Journal. 1997; 314(7095): 1675.

6. Sin SY, Ghosh A, Tang LC, and Chan V. *Ten Years Experience of Antenatal Mean Corpuscular Volume Screening and Prenatal Diagnosis for Talasemia in Hongkong*. Journal of Obstetrics and Gynaecology Research. 2000; 26(3): 203-208.
7. Health Technology Assesment. *Pencegahan Talasemia (Hasil Kajian HTA tahun 2009)*. Jakarta: Dirjen Bina Pelayanan Medik Kementerian Kesehatan Republik Indonesia; 2010.
8. Centers for Disease Control and Prevention. *Thalassemia*. (Online). <http://www.cdc.gov/ncbddd/thalassemia/indeks.html>.
9. Li LY, Li Q, Song LL, et al. *The value of MCV, MCH and HbA(2) in Laboratory Screening of Thalassemia*. Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi. 2012; 47(2): 96-100.
10. Buckingham L. *Molecular Diagnostics: Fundamentals, Methods and Clinical Applications*. 2nd edition. Canada: FA Davis Company; 2011.
11. Mahadik CT. *Experience With Multiplex ARMS (MARMS)-PCR for the Detection of Common Beta-Thalassemia Mutations in India*. Cardiovascular & Hematological Agents in Medicinal Chemistry. 2012; 10(1): 14-24.
12. Hernanda PY, Tursilowati L, Arkesteijn SG, et al. *Towards a Prevention Program for Beta-Talasemia. The Molecular Spectrum in East Java, Indonesia*. Hemoglobin. 2012; 36(1): 1-6.
13. Harteveld CL and Higgs DR. *Alpha-Thalassaemia*. Orphanet Journal of Rare Diseases. 2010; 5(1): 13.
14. Muncie HR and Campbell JS. *Alpha and Beta Thalassemia*. American Family Physician. 2009; 80(4): 339-344.
15. Shen C, Jiang YM, Shi H, et al. *Evaluation of Indices in Differentiation between Iron Deficiency Anemia and Beta-Talasemia Trait for Chinese Children*. Journal of Pediatric Hematology/Oncology. 2010; 32(6): 218-222.
16. Yong KN, Wadsworth D, Langlois S, Yong SL, and Wilson RD. *Talasemia Carrier Screening and Prenatal Diagnosis among the British Columbia (Canada) Population of Chinese Descent*. Clinical Genetics. 1999; 55(1): 20-25.
17. Weatherall DJ and JB Clegg. *The Thalassaemia Syndromes*. 4th edition. Oxford: Blackwell Science; 2008.
18. Weatherall DJ. *Phenotype-Genotype Relationships in Monogenic Disease: Lessons from the Thalassaemias*. Nature Reviews Genetics. 2001; 2(4): 245-55.
19. Vehapoglu A, Ozgurhan G, Demir AD, et al. *Hematological Indices for Differential Diagnosis of Beta Thalassemia Trait and Iron Deficiency Anemia*. 2014; 2014: 7.
20. Dell'edera D, Epifania AA, Milazzo GN, et al. *Identification of Patients with Defects in the Globin Genes*. Journal of Prenatal Medicine. 2013; 7(4): 47-50.
21. Singh SP and Gupta S. *Molecular Pathogenesis and Clinical Variability of Homozygous Beta 0-Thalassemia in Populations of Jammu Region of J&K State (India)*. Hematology. 2006; 11(4): 271-275.
22. Pramoongjago P, Harahap A, Taufani RA, Setianingsih I, Marzuki S, and Harahap A. *Rapid Screening for the Most Common  $\alpha$  Thalassaemia Mutations in South East Asia by PCR Based Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis (PCR-RFLP)*. Journal of Medical Genetics. 1999; 36(12): 927-938.