

HASIL PENELITIAN



**KARAKTERISTIK MOLEKULAR GENETIK PENDERITA
THALASSEMIA BETA DI JAWA TIMUR YANG
MENDAPATKAN PENGOBATAN DI RUMAH SAKIT DR
SOETOMO SURABAYA**

OLEH

Yuli Syafitri

011829079301

Prodi Patologi Klinik

**FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA**

2022

LEMBAR PENGESAHAN

Penelitian

**KARAKTERISTIK MOLEKULAR GENETIK PENDERITA THALASSEMIA BETA
DI JAWA TIMUR YANG MENDAPATKAN PENGOBATAN DI RUMAH SAKIT DR
SOETOMO SURABAYA**

Nama :

Yuli Syafitri

011829079301

Pembimbing 1



Dr. Yetti Hernaningsih, dr., SpPK(K)
NIP 19731220 200501 2 001

Pembimbing 2



Dr. Mia Ratwita Andarsini, dr., SpA(K)
NIP 19730124 199903 2 002

**Kepala Program Studi Sub Spesialis
Departemen Patologi klinik FK UNAIR/RSUD**

Dr. Soetomo



Prof. Dr. Aryati, dr. MS, Sp.PK (K)
NIP 19630815 199002 2 001

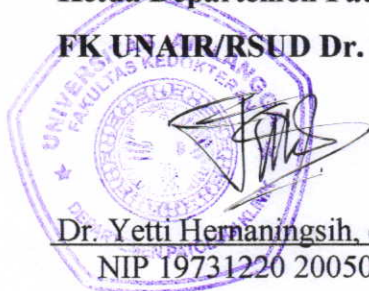
**Ka Urusan Litbang Departemen
Patologi klinik FK UNAIR/RSUD**

Dr. Soetomo



Prof. Dr. Jusak Nugraha, dr. MS, Sp.PK (K)
NIP 19560214 198502 1 001

**Ketua Departemen Patologi Klinik
FK UNAIR/RSUD Dr. Soetomo**



Dr. Yetti Hernaningsih, dr., SpPK(K)
NIP 19731220 200501 2 001

DAFTAR ISI

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1.Latar Belakang	1
1.2.Rumusan Masalah	3
1.3.Tujuan Penelitian	4
1.4. Manfaat Penelitian	4

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA.

2.1 Thalassemia	5
2.1.1 Defenisi	5
2.1.2 Struktur dan Sintesis Hemoglobin	5
2.1.3 Patofisiologi thalassemia.	9
2.2 Diagnosis Laboratorium Thalassemia β	12
2.3 Diagnostik Molekuler Thalassemia β	13
2.4 Thalassemia β dan mutasinya	15
2.4.1 Thalassemia β Non Delesi.	12
2.3.3 Thalassemia β Delesi.	18
2.5 Thalassemia β di Indonesia	18

BAB 3

KERANGKA KONSEPTUAL

3.1 Kerangka Konseptual	21
3.2 Penjelasan Kerangka Konseptual.	22

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1. Jenis dan Rancangan Penelitian	24
4.2 Populasi Sampel, Teknik pengambilan sampel dan Kriteria Sampel	24

3.3 Variabel Penelitian.	26
3.4 Lokasi dan Lama Penelitian	27
3.5 Peralatan dan Bahan Penelitian.	27
3.6 Prosedur Penelitian.	27
3.7 Skema Alur Penelitian.	28
3.8 Analisis.	28
3.9 Etik.	29
 BAB 5	
HASIL PENELITIAN	30
 BAB 6	
PEMBAHASAN	33
 BAB 7	
PENUTUP	
7.1 Kesimpulan	37
7.2 Saran.	38
 DAFTAR PUSTAKA	39

DAFTAR SINGKATAN

ACRS	: <i>Artificially-Created Restriction Site</i>
ARMS	: <i>Amplification Refractory Mutation Scanning</i>
DNA	: Asam Deoksiribonukleat
EDTA	: Etilendiamintetraasetat
Hb CS	: Hemoglobin Constant Spring
HS1	: <i>DNaseI hypersensitive sites</i>
IVS	: <i>Intervening Sequence</i>
LCR	: <i>Locus Control Region</i>
MCS	: <i>Multispecies Conserved Sequences</i>
MLPA	: <i>Multiplex Ligation Dependent Probe Amplification</i>
mRNA	: <i>messenger-RNA</i>
NGS	: <i>Next Generation Sequencing</i>
NMD	: <i>Nonsense Mediated RNA Decay</i>
NTDT	: <i>Non Transfusion Dependent Thalassemia</i>
PCR	: <i>Polymerase Chain Reaction</i>
RFLP	: <i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>
RNA	: Asam Ribonukleat
SCD	: <i>Sickle Cell Disease</i>
SGOT	: Serum glutamic oxaloacetic transaminase
SGPT	: Serum glutamic pyruvic transaminase
TDT	: <i>Transfusion Dependent Thalassemia</i>

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1. Struktur klaster gen α pada kromosom 16	6
Gambar 2.2. Struktur klaster gen β pada kromosom 11.	7
Gambar 2.3. Struktur gen globin pada fase embrional, fetus dan dewasa.	8
Gambar 2.4. Proses perubahan globin.	8
Gambar 2.5. Struktur klaster gen α dan β dan patofisiologi thalassemia	9
Gambar 2.6. Efek Produksi berlebih rantai globin α pada thalassemia β	12
Gambar 2.7. Skema susunan kelompok gen globin β	15
Gambar 3.1. Kerangka Konseptual Penelitian	21
Gambar 4.1 Skema Alur Penelitian	28

DAFTAR TABEL

Tabel 2.1 Penelitian Thalassemia di Indonesia	20
Tabel 4.1 Definisi operasional variable penelitian	26
Tabel 5.1 Data Demografik Subjek.	30
Tabel 5.2. Hasil Analisis Hemoglobin Elektroforesis	30
Tabel 5.3 Hasil Pemeriksaan Mutasi Genetik menggunakan Sanger	31
Tabel 5.4 Hasil Pemeriksaan laboratorium hematologi, fungsi hati dan ginjal	31

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Penyakit Talassemia banyak terjadi di Asia Tenggara dan Selatan, di Timur Tengah, di negara-negara Mediterania, dan di Afrika Utara dan Tengah. Namun, thalassemia sekarang juga menjadi semakin umum di Eropa Utara dan Amerika Utara (Brancaleoni et al., 2016). Adanya perkawinan campuran antara berbagai kelompok etnis telah mengembangkan thalassemia di hampir setiap negara di dunia, termasuk Eropa Utara di mana sebelumnya thalassemia tidak ada dan sekarang thalassemia menjadi masalah kesehatan umum utama (Cao & Galanello, 2010)

Thalassemia β memiliki prevalensi yang tinggi, berkisar 80-90 juta orang dilaporkan menjadi karier di seluruh dunia (1.5% dari populasi global) (Origa, 2017). Data dari *World Bank* menunjukkan bahwa 7% dari populasi dunia merupakan pembawa sifat thalassemia. Setiap tahun sekitar 300,000-500,000 bayi baru lahir disertai dengan kelainan hemoglobin berat dan 50,000-100,000 anak meninggal akibat thalassemia β . Sebanyak 80% dari jumlah tersebut berasal dari negara berkembang. Data epidemiologi mendapatkan bahwa di Indonesia frekuensi gen pembawa thalassemia β berkisar 3-10%, dan jika dihitung menggunakan prinsip Hardy-Weinberg tentang frekuensi alel dari generasi ke generasi maka setiap tahunnya akan lahir 2500 bayi dengan thalassemia mayor (Pedoman Nasional Pelayanan Kedokteran Tata Laksana Talasemia, 2018).

Penyakit thalassemia belum dapat disembuhkan, hingga saat ini belum ada pengobatan yang ideal, kecuali transplantasi sumsum tulang (Huang et al., 2020). Akibatnya, akan menciptakan suatu permasalahan ekonomi untuk pembiayaannya. Dalam system pembiayaan asuransi Kesehatan yang berlaku di Indonesia yakni Badan Penyelenggara Jaminan Sosial (BPJS) didapatkan bahwa thalassemia menempati urutan ke-lima terbesar dalam kelompok penyakit katastrofik dengan pembiayaan terbesar yang ditanggung program Jaminan Kesehatan Nasional-Kartu Indonesia Sehat (JKN-KIS) (BPJS Kesehatan RI, 2021).

Di Indonesia, penderita thalassemia mengalami mutasi yang sangat beragam, bergejala mulai dari yang ringan hingga berat. Namun demikian, pengelolaan thalassemia di Indonesia masih terbatas pada pengobatan suportif, seperti transfusi darah, kelasi besi, pemantauan komplikasi, dukungan psikososial dan transisi yang nyaman dari klinik anak ke dewasa (Wahidiat et al., 2020).

Thalassemia β muncul karena adanya perubahan di kromoskrom 11, 2 gen HBB. Perubahan dapat berupa delesi dan mutasi yang dapat mengakibatkan penurunan sintesis rantai globin β . Gangguan sintesis rantai globin tersebut menyebabkan gangguan produksi hemoglobin yang akhirnya dapat menyebabkan anemia mikrositik hipokromik karena hemoglobinisasi sel darah merah yang rusak (Bajwa & Basit, 2022; Do & Tran, 2014) .

Gejala utama yang tampak secara umum pada thalassemia adalah anemia. Anemia terjadi karena sintesis hemoglobin yang tidak sempurna sehingga sel darah merah mudah rusak/lisis dan dirombak oleh limpa. Selain anemia, karena tingkat perombakan sel darah merah yang tinggi, dapat pula ditemukan kondisi splenomegali pada pasien thalassemia (Do & Tran, 2014).

Thalassemia dengan gejala klinis yang beragam berhubungan dengan sebarapa banyak gen yang berubah karena penurunan gen dari orang tua (Origa, 2017). Secara umum, terdapat tiga gambaran klinis thalassemia β yakni: Thalassemia mayor (TM) yang disebut juga “*Cooley’s anemia*” dan “*Mediterranean anemia*”; Thalassemia intermedia (TI); dan Thalassemia minor yang disebut “thalassemia β karier” atau “thalassemia β trait” atau “thalassemia heterozigot” (Origa, 2017) .

Delesi pada genetik bermacam-macam, disebut sebagai polimorfisme genetik. Mengetahui polimorfisme genetik pada penderita thalassemia sejak awal perlu diketahui karena penting untuk genetik konseling dan prenatal screening thalassemia (Huang et al., 2020)

Pada akhir 1970-an program populasi percontohan diarahkan untuk mencegah Thalassemia β mayor melalui skrining karier (pembawa), konseling, dan diagnosis prenatal yang dimulai pada beberapa populasi berisiko di wilayah Mediterania [Siprus, Sardinia, beberapa wilayah di Kontinental Italia (Delta Area Po, Sisilia), dan Yunani]. Saat ini, beberapa negara telah menyusun program pencegahan nasional yang komprehensif, yang meliputi kesadaran dan pendidikan publik, skrining karier, dan konseling, serta informasi tentang diagnosis prenatal dan diagnosis praimplantasi. (Cao & Kan, 2013)

1.2 Rumusan Masalah

Bagaimanakan frekuensi dan distribusi polimorfisme genetik pada penderita thallasemia β di Jawa Timur yang mendapatkan pengobatan di RS Dr. Soetomo sebagai pusat rujukan Indonesia Timur?

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan umum

1. Mempelajari frekuensi dan distribusi polimorfisme genetik pada penderita thalassemia β di Jawa Timur yang mendapatkan pengobatan di RS Dr. Soetomo
2. Menambah data regional mengenai polimorfisme genetik thalassemia β di daerah Jawa Timur

1.3.2 Tujuan khusus

1. Mempelajari frekuensi dan mutasi genetik penderita thalassemia β

Manfaat Penelitian

1.3.3 Manfaat teori

Mendapatkan data distribusi polimorfisme genetik penderita thalassemia β di Jawa Timur yang mendapatkan pengobatan di RSUD Dr. Soetomo Surabaya

1.3.4 Manfaat Praktis

1. Memberi sumbangan basis data genetik penderita thalassemia β untuk kegiatan screening thalassemia nasional
2. Memberi sumbangan basis data genetik penderita thalassemia β pada instansi terkait dalam mengambil kebijakan guna penyusunan program deteksi dini pada penderita thalassemia

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Thalassemia

2.1.1 Defenisi

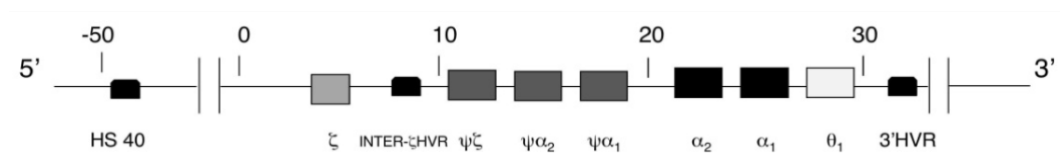
Thalassemia merupakan suatu kondisi genetik yang diturunkan yang mengakibatkan gangguan pada molekul hemoglobin (Angastiniotis & Lobitz, 2019). Penyakit ini mengakibatkan terjadi hemolitik sel darah merah yang ditandai dengan menurunnya atau tidak adanya sintesis salah satu rantai α , β dan atau rantai globin lain yang membentuk struktur normal molekul hemoglobin utama pada orang dewasa. Thalassemia merupakan salah satu penyakit yang mengenai system hematologi dan seringkali dibahas bersamaan Hemoglobinopati. Hemoglobinopati merupakan kelainan struktur hemoglobin yang dapat mempengaruhi fungsi kelangsungan hidup sel darah merah. Oleh sebab itu Thalassemia dapat dikaitkan dengan kelainan jumlah penyusun hemoglobin, sedangkan hemoglobinopati adalah kondisi yang terkait dengan perubahan struktur hemoglobin. (Rujito, 2019)

Thalassemia β disebabkan oleh berkurangnya rantai globin β (β^+) atau tidak adanya rantai β (β^0) pada tetramer hemoglobin (Hb) yang normal membentuk dua rantai globin α dan dua rantai globin β (Cao & Galanello, 2010).

2.1.2 Struktur dan Sintesis Hemoglobin

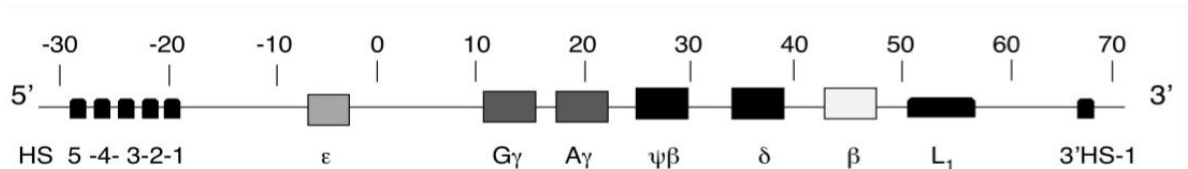
Hemoglobin adalah protein pengikat oksigen di dalam eritrosit yang berperan mengangkut oksigen dari paru-paru ke jaringan. Setiap molekul hemoglobin adalah tetramer yang terbuat dari empat rantai globin polipeptida. Setiap subunit globin mengandung bagian heme yang terbentuk dari cincin protoporfirin organik dan ion besi pusat dalam bentuk *ferrous* (Fe^{2+}). Molekul besi di setiap bagian heme dapat mengikat dan melepaskan oksigen, memungkinkan transportasi oksigen dalam tubuh. Jenis hemoglobin yang paling umum pada orang dewasa adalah HbA, yang terdiri dari dua subunit rantai globin α dan dua rantai globin β . Dua komponen utama sintesis hemoglobin adalah produksi globin dan sintesis heme (Farid et al., 2021).

Penghasil rantai globin α berasal dari gen α -like yang terletak pada 135-155 kb pada kromosom 16 (16p13.3) yang terdiri dari tiga gen fungsional yakni gen embrionik ζ (HBZ), dua gen α (HBA1 dan HBA2), tiga pseudogen yakni pseudo ζ (HBZps), pseudo α_1 (HBA1ps) dan pseudo α_2 (HBM), terdapat juga gen θ (HBQ) yang fungsinya tidak diketahui. HS-40 merupakan pengatur utama pada lokus gen α , terletak 40 kb hulu dari gen ζ (Gambar 1) (Farashi & Hartevelde, 2018; Rujito, 2019).



Gambar 2.1. Struktur klaster gen α pada kromosom 16 (Grosso & Sessa, 2014)

Sedangkan rantai globin β dikode oleh gen struktural pada kluster gen β -like pada kromosom 11 (11p 15.5). Kluster tersebut terdiri dari lima gen fungsional yakni ϵ (HBE), $G\gamma$ (HBG2), $A\gamma$ (HBG1), δ (HBD) dan β (HBB) (Gambar 2), yang nantinya akan membentuk tetramer Hb yang berbeda : embrio (Hb Gower-1 ($\zeta 2\epsilon 2$), Hb Gower 2 ($\alpha 2\epsilon 2$), dan Hb Portland ($\zeta 2\beta 2$)), fetus ($\alpha 2\gamma 2$) dan dewasa (HbA, $\alpha 2\beta 2$ dan HbA2, $\alpha 2\delta 2$). Ekspresi gen globin tersebut tergantung pada sekuens promotor lokal serta wilayah kontrol lokus β globin (β -LCR). (Shang & Xu, 2017; Thein, 2018)

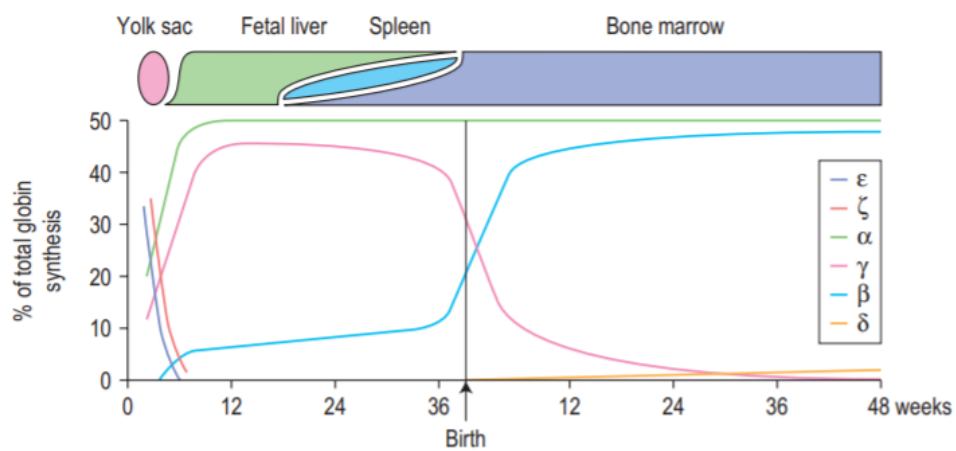


Gambar 2.2. Struktur kluster gen β pada kromosom 11(Groso et al.2014)

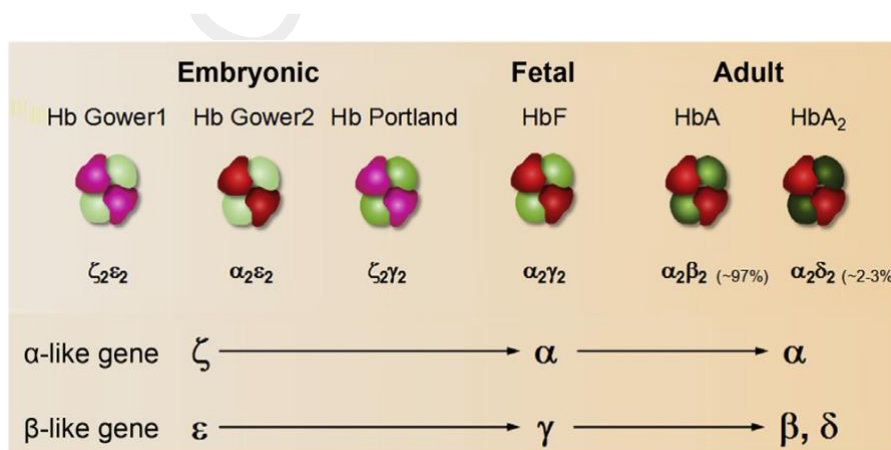
Pada masa janin hingga perinatal, hemoglobin yang ada adalah HbF ($\alpha 2\gamma 2$), dan pada anak yang berumur lebih dari 1 tahun sampai dewasa normal, mulai membentuk, terdiri dari HbA ($\alpha 2\beta 2$) dan HbA2 ($\alpha 2\delta 2$). Pada 6 bulan pertama perkembangan janin kehidupan neonatal, terjadi pola yang kompleks dari ekspresi gen globin yang disebut hemoglobin switch (Sankaran & Orkin, 2013).

Pada awal kehidupan embrional sampai delapan minggu, sintesis globin di produksi di *yolk sac* dan hati. Rantai δ yang berkombinasi dengan rantai ϵ akan membentuk Hb Gower 1, Hb Gower 2 dan Hb Portland. Ekspresi yang singkat dari gen globin pada masa embrio, maka pada akhir kehamilan akan dibentuk

hemoglobin utama pada janin yaitu Hemoglobin F ($\alpha_2\gamma_2$) dan organ yang terlibat dalam sintesis rantai globin tersebut adalah hati, limpa dan sumsum tulang. kemudian akan digantikan oleh rantai β -globin dewasa yaitu hemoglobin A ($\alpha_2\beta_2$) dan hemoglobin A2 ($\alpha_2\delta_2$) (Gambar 3 dan 4) (Bhagavan NV & Ha CE, 2011). Bisa juga terdapat HbF dalam jumlah rendah 0.2-7% (Thein, 2013).



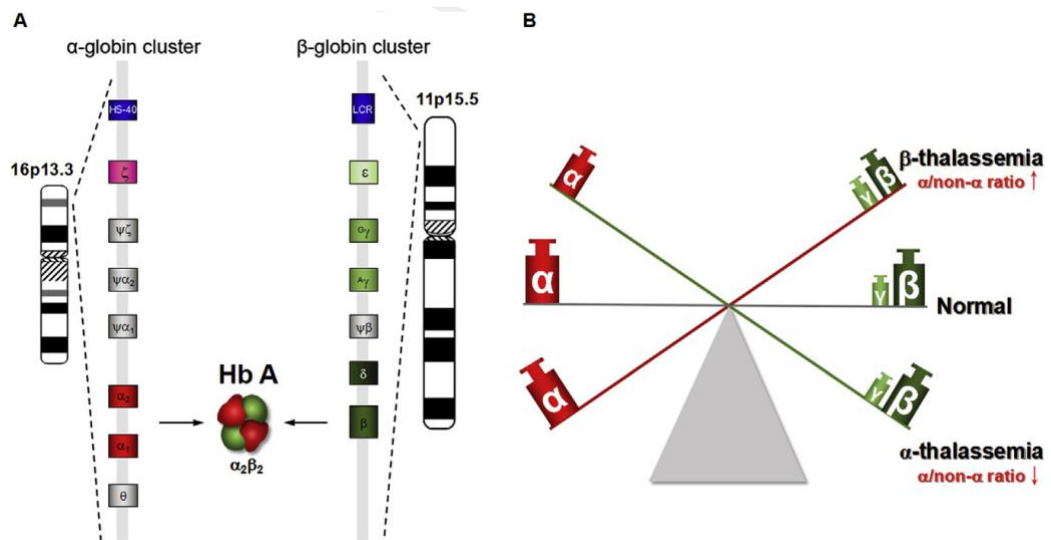
Gambar 2.3. Struktur gen globin pada fase embrional, fetus dan dewasa (Thein SL, 2011)



Gambar 2.4. Proses perubahan globin (Shang & Xu, 2017)

2.1.3 Patofisiologi Thalassemia

Timbulnya patofisiologi thalassemia adalah akibat ketidakseimbangannya produksi rantai α dan non α . Normalnya rasio antara rantai α banding non α adalah 1 banding 1 (Shang & Xu, 2017). Setiap terjadi pengurangan produksi rantai globin dalam sel darah merah, maka akan menyebabkan akumulasi rantai yang diproduksi secara normal tidak membentuk heterotetramer yang seimbang dari pasangan heterolognya. Jika rantai α globin tidak diproduksi dalam jumlah memadai akan terjadi akumulasi rantai β globin (thalassemia- α). Jika rantai β globin tidak diproduksi adekuat maka rantai α globin akan terakumulasi (thalassemia β) (Angastiniotis & Lobitz, 2019). Pada thalassemia β , jumlah rantai β -like kurang dari jumlah rantai α (Gambar 5). Derajat ketidakseimbangan tersebut sebanding dengan berat ringannya penyakit (Shang & Xu, 2017)



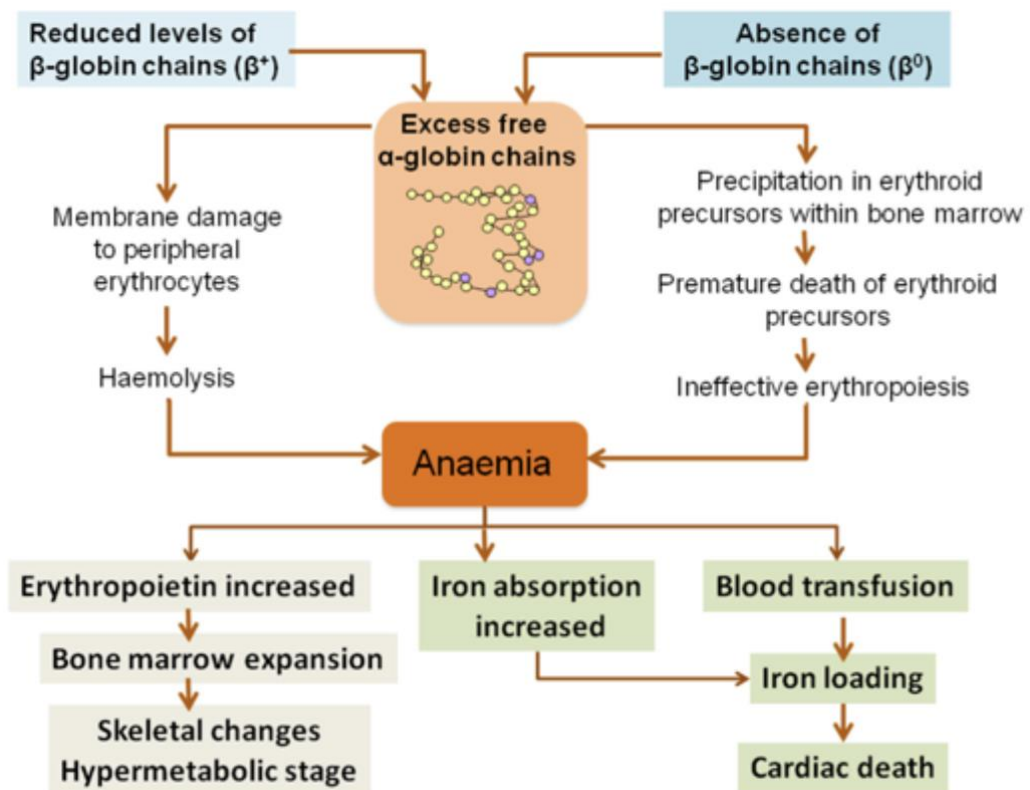
Gambar 2.5. Struktur klaster gen α dan β (A) dan patofisiologi thalassemia (B) (Xang & Xu, 2017)

Efek dari berkurang atau tidak adanya rantai globin β mengakibatkan berkurang produksi hemoglobin dan sintesis rantai globin yang tidak seimbang, pengurangan nilai hemoglobin sel rata-rata (MCH) dan volume sel rata-rata (MCV). Selanjutnya yang sangat memberikan dampak adalah rantai globin α yang berlebih yang mengakibatkan destruksi sel darah premature dalam sumsum tulang dan ekstrasmeduler. Hal ini disebut sebagai “*ineffective erythropoiesis*” yang merupakan ciri khas thalassemia β (Thalassaemia International Federation, 2014).

Sebagai respon awal terhadap “*ineffective erythropoiesis*” dan anemia adalah meningkatkan produksi eritropoetin, terjadi hiperplasia eritroid yang akhirnya akan mengakibatkan deformitas skeletal, osteoporosis dan bahkan terkadang massa ekstrasmeduler dan splenomegali. Salah satu efek dari anemia yakni kegagalan jantung. Eritropoesis yang tidak efektif berkaitan dengan peningkatan daya serap zat besi dari absorpsi intestinal yang disebabkan oleh hepsidin, sebuah peptida yang dihasilkan dari hepatosit yang berperan dalam regulasi homeostasis zat besi (Gambar 6) (Thalassaemia International Federation, 2014).

Derajat anemi sangat bervariasi, tergantung dari mutasi atau kombinasi pada setiap individu. Ada sebanyak 200 mutasi pada gen klaster β dan beberapa mutasi tidak menghasilkan produksi rantai globin β yang disebut mutasi β^0 . Sedangkan mutasi yang masih menghasilkan sebagian rantai globin β disebut mutasi β^+ dan β^{++} . Pengobatan anemia berat adalah transfuse darah. Pada thalassemia *transfusion dependent* (TDT), transfuse darah regular biasanya

dimulai dari masa anak-anak, mengakibatkan penumpukan zat besi. Adanya zat besi bebas yang disebut *labile plasma iron* (LPI) menghasilkan spesies oksigen reaktif yang mengakibatkan kerusakan organel dan kematian sel, terutama hepatosit, kardiomyosit dan sel-sel kelenjar endokrin. Pada thalassemia *non-transfusion dependent* (NTDT), kelebihan zat besi sekunder terjadi karena peningkatan zat besi dari saluran cerna. Meskipun demikian, terjadinya penumpukan zat besi pada pasien NTDT membutuhkan waktu lama dibandingkan pada pasien TDT (Angastiniotis & Lobitz, 2019).



Gambar 2.6. Efek produksi berlebih rantai globin α pada thalassemia β (Thalassaemia β) (International Federation, 2014)

2.2. Diagnosis Laboratorium Thalassemia β

Diagnosis laboratorium pemeriksaan thalassemia membutuhkan beberapa tes termasuk indeks sel darah merah, kadar Hemoglobin dan analisis DNA. Analisis sel darah merah pada penderita thalassemia pada alat hematology analyzer memperlihatkan mikrositosis dan kandungan hemoglobin sel darah merah yang rendah adalah salah satu penanda terjadinya thalassemia. Namun, hal demikian juga berlaku pada kasus defisiensi besi, sehingga akan sulit dibedakan antara terjadinya thalassemia trait dan defisiensi besi (Munkongdee et al., 2020).

Analisis hemoglobin saat ini dapat diperiksa menggunakan *high-performance liquid chromatography* (HPLC) atau *capillary zone electrophoresis* (CE). Kedua system tersebut memberikan analisis kualitatif dan kuantitatif komponen hemoglobin dalam waktu yang singkat. Genotip thalassemia dapat dikarakteristikan oleh intensitas antara rantai globin α dan β atau rasio α/β -mRNA, tetapi hal tersebut masih bersifat presuntif. Hanya analisis DNA saja yang dapat menentukan mutasi thalassemia secara spesifik (Munkongdee et al., 2020).

Analisis DNA semakin berkembang dalam 40 tahun ini. Dimulai dari metode pemeriksaan Southern Blotting, amplifikasi PCR, *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP), *Amplification Refractory Mutation Scanning* (ARMS) dan *direct sequencing*. Saat ini *Next generation sequencing* (NGS) diaplikasikan untuk pemeriksaan seluruh genom dalam mencari mutasi poin tunggal, delesi, insersi dan translokasi (Harteveld & Higgs, 2010; Rujito, 2019).

Diagnosis DNA digunakan untuk memastikan jenis mutasi yang terjadi dan pada beberapa kasus, diagnosis DNA menjadi diagnosis definitif karena gambaran darah dan elektroforesis hemoglobin yang meragukan (Rujito, 2019)

2.3. Diagnostik Molekuler Thalassemia β

Tes molekuler yang umum digunakan pada pemeriksaan hemoglobinopati yakni RFLP, diskriminasi Alel menggunakan *Real Time PCR end point* dan sekuensing DNA (CDC, 2015).

a. Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)

Keuntungan penggunaan metode ini yakni mudah digunakan dan biaya yang murah. Sangat cocok digunakan pada laboratorium kecil. Keterbatasan metode ini adanya restriksi parsial (pemotongan yang tidak sempurna) pada DNA yang dapat mengakibatkan specimen homozigot diinterpretasikan secara tidak benar (CDC, 2015).

b. Diskriminasi Alel menggunakan *Real-time PCR*

Diskriminasi alel mengukur fluoresen pada akhir PCR untuk menentukan mutasi yang terjadi. Dengan tehnik ini, primer *forward* dan *reverse* mencakup area yang diinginkan digunakan serta probe hidrolisis. Metode ini memiliki output yang lebih tinggi dibandingkan RFLP karena hasilnya dihasilkan tepat setelah amplifikasi berakhir, tanpa pemrosesan lebih lanjut. Limitasi metode ini biaya yang tinggi untuk probe dan kebutuhan untuk mesin *real-time PCR* (CDC, 2015).

c. Sekuensing DNA

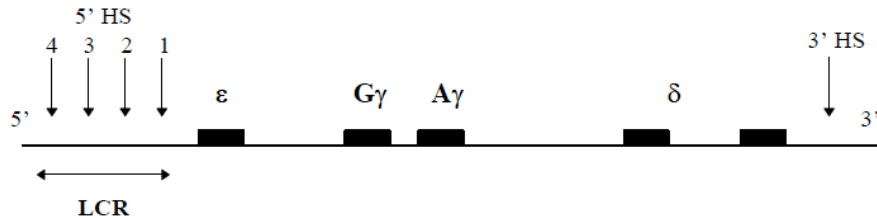
Mutasi dapat diidentifikasi dengan mengurutkan produk PCR, biasanya menggunakan metode penghentiandideoksi Sanger. Ini membutuhkan produksi untai DNA tunggal sebagai cetakan. Metode ini memungkinkan identifikasi mutasi baru atau langka yang ada dalam populasi (Munkongdee et al., 2020).

Teknologi sekuensing Next-Generation memiliki kemampuan untuk melakukan sekuens seluruh genom dengan output yang sangat tinggi yang tidak dapat dilakukan menggunakan metode Sanger (Munkongdee et al., 2020). Sekuensing adalah metode deteksi yang paling mahal dibandingkan dua pemeriksaan sebelumnya, namun memberikan hasil yang paling komprehensif untuk gen beta globin (CDC, 2015).

2.4 Thalassemia β dan mutasinya

Dasar molekuler terjadinya thalassemia β sangat beragam. Yang paling banyak merupakan mutasi titik (perubahan basa tunggal, sedikit delesi atau insersi) jika dibandingkan pada thalassemia α yang banyak disebabkan oleh delesi. Mutasi ini bisa terjadi di urutan ekson atau intron. Kelompok gen globin β terletak pada lengan pendek kromosom 11 (11p.15.5) dengan ukuran kurang lebih 90 kb. Secara berurutan kelompok gen β adalah 5- ϵ -G γ -A γ - ψ β - δ - β -3'. Di sebelah hulu gen globin ϵ sejauh 6-18 kb terdapat *Locus Control Region* (LCR) yang bersifat *DNAseI hypersensitive sites* (HS1-5). Elemen regulasi di daerah hilir (3'HS1) terletak dalam

jarak 20kb dari gen β . Ekspresi kluster gen dikontrol oleh promoter pada masing-masing gen dengan LCR dan *downstream* regulator. (Rujito, 2019; Thein, 2018)



Gambar 2.7. Skema susunana kelompok gen globin β . Kluster gen globin β terdiri dari 5 gen fungsional ϵ , $G\gamma$, $A\gamma$, δ dengan LCR di bagian hulu gen ϵ serta elemen regulator di hilir gen β . (Rujito, 2019)

Gen globin β terdiri dari 3 ekson yang dipisahkan oleh 2 intron (IVS, *Intervening sequence*). Ekson satu merupakan ekson terpendek, tersusun atas 30 kodon. Ekson 2 merupakan ekson terpanjang, dari kodon 31-104. Ekson ketiga dari kodon 105-146. Intron pertama (IVS1) terletak antara kodon 30 dan 31 dengan Panjang 130 bp. Sedangkan intron kedua (IVS2) terletak di antara kodon 104-105 dengan ukuran 850 bp. (Rujito, 2019)

2.4.1. **Thalassemia β Non delesi**

Mutasi non delesi bisa disebabkan oleh substitusi basa tunggal, insersi kecil ataupun delesi dari satu atau dua basa yang terletak di dalam gen atau urutan yang mengapit langsung. Hal tersebut berperan dalam penurunan seluler gen globin β melalui beberapa fase dalam ekspresi gen, yakni transkripsi menjadi RNA dan translasi mRNA globin β . Diperkirakan setengah dari mutasi non delesi menginaktivasi gen β sehingga mengakibatkan terjadinya thalassemia β^0 . (Thein, 2018)

Berdasarkan mekanisme terhadap terganggunya fungsi gen globin β , mutasi dibagi menjadi beberapa kelompok : (Shang & Xu, 2017)

- (1) Mutan yang mempengaruhi transkripsi seperti pada $\beta^{-101(C>T)}$ pada promotor atau $\beta^{CAP+39(C>T)}$ pada regio 5'UTR
- (2) Mutan yang mempengaruhi prosesing RNA seperti $\beta^{IVS1-110(G>A)}$ mengakibatkan lokasi pemotongan samar, $\beta^{PA(GATAAG)}$ pengurangan efisiensi proses pembelahan polyadenylasi, dan $\beta^{Term\ CD+32(A>C)}$ di 3'UTR.
- (3) Mutan yang mempengaruhi translasi RNA, seperti inisiasi mutasi kodon $\beta^{(ATG.GTG)}$, mutasi nonsense $\beta^{CD39(C>T)}$, dan $\beta^{CD41-42(-CTTT)}$.

Mutasi transkripsional

Mutasi transkripsional melibatkan sekuens DNA yang membentuk promotor globin β (dari 100 bp ke hulu ke tempat inisiasi transkripsi, termasuk yang berfungsi penting, box CACCC, CCAAT, dan ATAA) atau rentang 50 nukleotida pada 5'UTR. Secara umum, hasil mutan transkripsional ini bersifat ringan hingga minimal pada output globin β seperti pada β^+ atau β^{++} dan bersifat 'silent'. Silent thalassemia β banyak ditemukan pada daerah Mediterania yakni mutasi-101C>T yang kemudian berinteraksi dengan mutasi lainnya atau thalassemia β yang berat menghasilkan bentuk thalassemia β yang lebih ringan (Thein, 2018).

Pada grup mutasi transkripsional, variasi grup suku pada fenotipnya yang diobservasi ; individu kulit hitam dengan homozigot mutasi -29A>G punya gejala klinis yang ringan. Sedangkan pada orang Cina dengan mutasi

homozigot yang sama memiliki gejala anemia berat dan merupakan penerima transfusi rutin. Penyebab perbedaan tersebut belum diketahui tetapi diperkirakan oleh karena perbedaan kromosomal dimana mutasi yang tampaknya identik telah muncul. Satu perbedaannya adalah polimorfisme C-T pada posisi hulu -158 pada gen globin $G\gamma$ (Xmn1- $G\gamma$) yang terdapat pada kromosom β membawa mutasi -29A>G pada kulit hitam tetapi tidak terdapat pada suku Cina.(Thein, 2018)

Mutasi yang mempengaruhi prosesing RNA

Banyak mutasi yang mengganggu proses transkripsi mRNA primer, yakni pada dinukleotida invariant sekuens GT atau AG pada sambungan ekson-intron mencegah terjadinya sambungan normal, sehingga menjadi penyebab terjadi thalassemia β^0 . Mutasi yang melibatkan urutan berdekatan dengan dinukleotida GT atau AG memungkinkan penyambungan normal, menghasilkan fenotip thalassemia β ringan hingga berat. Contohnya mutasi pada posisi 5 IVS1 G>C, T atau A, mengurangi pemotongan pada bagian donor yang dimutasi dibandingkan alel β normal. Meskipun mutasi IVS1-6 T>C biasanya dikaitkan dengan thalassemia β ringan, studi menunjukkan berbagai derajat berat pada mutasi yang identic, yang kemungkinan disebabkan pada latar belakang kromosom timbulnya mutasi. (Thein, 2018)

Mutasi translasional

Sekitar lebih dari setengah alel thalassemia β secara lengkap menginaktivasi gen melalui *stop codon premature* (PTCs), baik melalui substitusi basa tunggal atau kodon nonsense ataupun melalui mutasi frameshift.

Sebagai bagian dari mekanisme surveilans yang aktif pada kualitas kontrol pada mRNA yang diproses, mRNA yang menyembunyikan PTC dihancurkan dan tidak ditransport menuju sitoplasma, fenomena ini disebut (*nonsense mediated RNA decay* atau NMD) untuk mencegah akumulasi mutan koding mRNA untuk peptide terpotong. Pada beberapa fase PTC yang terjadi belakangan pada sekuens β pada 3' setengah ekson 2 dan ekson 3, NMD yang hilang dikaitkan dengan sejumlah mutan β -mRNA menuju sintesis varian rantai β yang sangat tidak stabil dan tidak berfungsi yang memiliki efek negatif (Thein, 2018) .

2.4.2 Thalassemia β Delesi

Thalassemia β jarang disebabkan oleh delesi. Delapan belas delesi terbatas pada gen HBB berkisar 25 bp – 6 kb. Delesi pada 619 bp pada akhir 3' gen β sering terjadi, tetapi terbatas pada populasi Sind di India dan Pakistan. Delesi berikutnya 7,7 kb 3' dari intron kedua HBB, merupakan heterozigot gen β^S pada wanita dengan SCD (*Sickle Cell Disease*) dari pulau Cape Verde. Delesi-delesi tersebut menghasilkan thalassemia β^0 , namun demikian peningkatan HbF cukup adekuat untuk mengkompensasi absensi HbA pada delesi homozigot.(Thein, 2018)

2.5. Thalassemia β di Indonesia

Penelitian yang dilakukan oleh Setianingsih tahun 1998, menemukan mutasi pada pasien thalassemia β yang terjadi di Indonesia (subjek berasal dari Sumatera, Jawa dan Sulawesi) meliputi; Hb E (29%), IVS1-nt5 (19%) dan Cd 35

(8%), frekuensi mutasi lainnya bervariasi 4% hingga kurang dari 1%. Pada delesi gen yang paling banyak didapati delesi β Filipin dan Hb Lepore. Hal ini Berdasarkan pemeriksaan analisis mutasi metode ARMS (*Amplification Refractory Mutation System*) dan ACRS (*Artificially-Created Restriction Site*). Sebelumnya berdasarkan penelitian oleh Lie Injo et al tahun 1989, Thalassemia β Mutasi yang telah diketahui terdapat di Indonesia sebanyak tujuh mutasi, yakni IVS1-nt5 (G>C), IVS1-nt1 (G>T), Cd 8-9 (+G), Cd 15 (TGG>TAG), Cd 41-42 (del CTTT), IVS-nt654 (C>T) dan Hb E (Cd 26, GAG>AAG). (Setianingsih et al., 1998)

Penelitian Handayani et al di Daerah Istimewa Yogyakarta terhadap pasien suspek karier thalassemia β menggunakan pemeriksaan metode PCR-RFLP (*Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism*), ARMS (*Amplification Refractory Mutation System*) dan DNA sequencing, didapatkan tiga mutasi InterVening Sequence (IVS)1-5 (G>C) sebanyak 71.4%, IVS1-2 (T>C) sebanyak 7.1% dan IVS1-1 (G>T) sebanyak 3.6%. terdapat dua mutasi frameshift Cd 35 (-C) 10.7% dan Cd 8/9 (+G) 3.6% dan mutasi missense Cd 6 (GAG>GTG). (Handayani et al., 2020)

Pemeriksaan molekular pada pasien suku Jawa yang menderita thalassemia β di Jawa Tengah bagian selatan yakni di daerah Banyumas, menggunakan pemeriksaan metode PCR-RFLP, ARMS dan *Direct sequencing*, didapatkan sebanyak 14 alel yakni : IVS1-5 (G>C) 43.5%, Cd 26 (Hb E) 28.2%, IVSI-1 (G>A) 5%, Cd 15 (TGG>TAG) 3.8%, IVSI-1 (G>T) 3.1%, Cd 35 (-C) 2.4%. sisanya termasuk Cd 41/42 (-TTCT), Cd 8/9 (+G), Cd 19 (AAC>AGC), Cd 17 (AAG>TAG), IVSI-2 (T>C), Cd 123/124/125 (-ACCCCACC), Cd 40 (-G) dan Cap +1 (A>C) semuanya berjumlah 1%. (Rujito et al., 2015b)

Pada studi thalassemia β yang dilaksanakan di Kalimantan Timur, didapatkan tujuh mutasi alel yakni Cd 26/HbE (GAG>AAG) 48,4%, IVS1-5 (G>C) 14.5%, IVS1-2 (T>C) 12,9%, Cd 35 (-C) 8,1%, IVS1-1 (G>T) 6,5% dan Cd 30 (AGG>ACG), Cd 60 (GTG>GAG) masing-masing 3,2%.(Susanto et al., 2020)

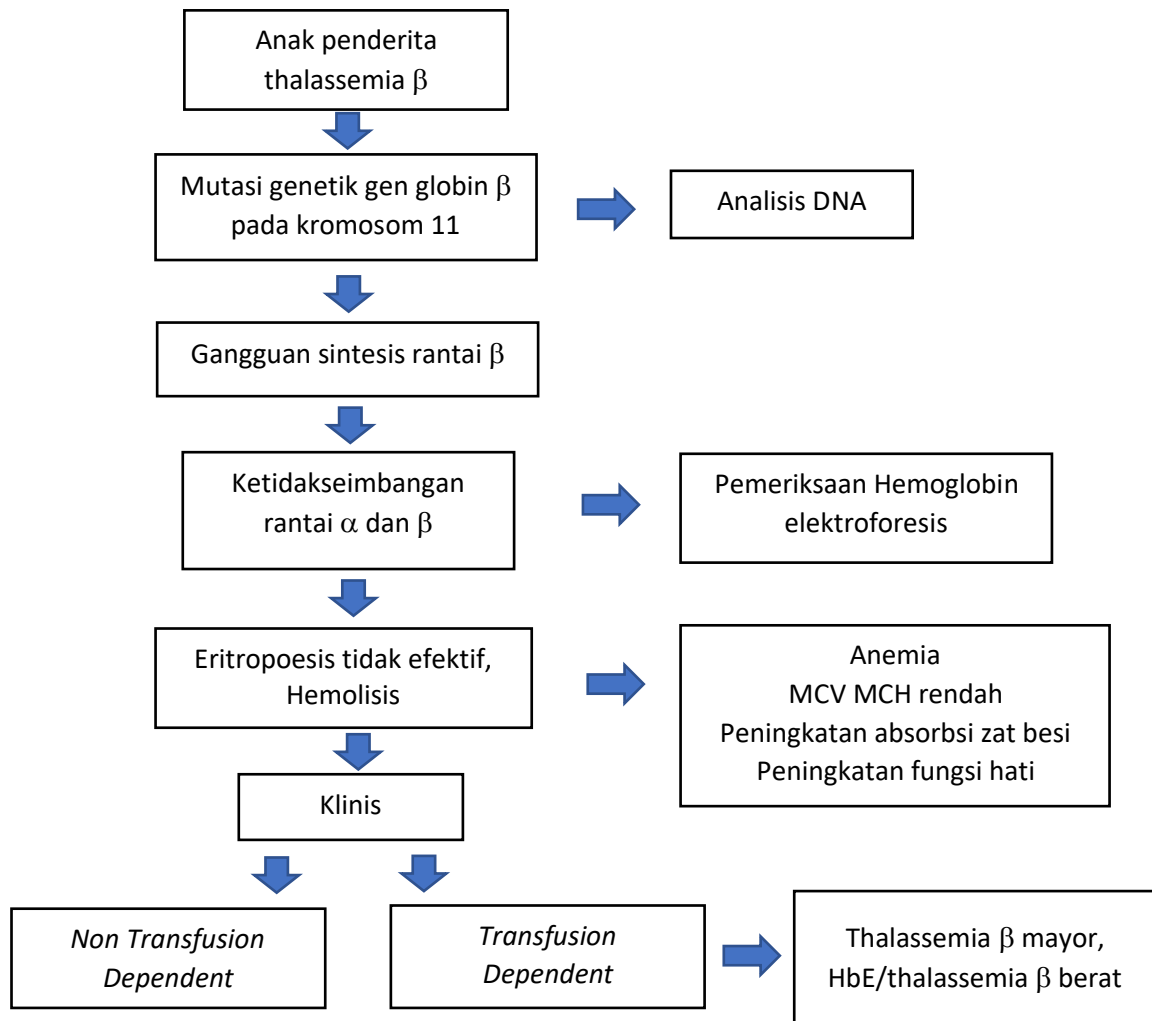
Tabel 2.1. Penelitian Thalassemia di Indonesia

Peneliti (Tahun)	Setianingsih et al (1998)	Handayani et al (2021)	Rujito et al (2015)	Susanto et al (2020)
Jumlah Subjek	56	28	209	31
Daerah	-	D.I Yogyakarta	Jawa Tengah	Kalimantan Timur
Suku	Sumatera, Jawa, Sulawesi	Jawa	Jawa	Jawa (64.5%)
Jenis Thalassemia	β	β	β	β
Pemeriksaan Genetik	Hb E (29%), IVS1-nt5 (19%) Cd 35 (8%),	IVS1-5 (G>C) (71.4%), IVS1-2 (T>C) (7.1%) IVS1-1 (G>T) (3.6%). Cd 35 (-C) (10.7%) Cd8/9(+G) (3.6%)	IVS1-5 (G>C) (43.5%), Cd 26 (Hb E) (28.2%), IVSI-1 (G>A) (5%), Cd 15 (TGG>TAG) (3.8%), IVSI-1 (G>T) (3.1%), Cd 35 (-C) (2.4%).	Cd 26/HbE (GAG>AAG) (48,4%), IVS1-5 (G>C) (14.5%), IVS1-2 (T>C) (12,9%), Cd 35 (-C) (8,1%), IVS1-1 (G>T) (6,5%) Cd 30 (AGG>ACG) (3,2%), Cd 60 (GTG>GAG) (3,2%).

BAB 3

KERANGKA KONSEPTUAL

3.1 Kerangka Konseptual



Gambar 3.1 Kerangka Konseptual Penelitian

3.2. Penjelasan Kerangka Konseptual

- Anak yang menderita thalassemia β , mengalami mutasi genetik pada gen globin penghasil rantai β yakni terletak pada kromosom 11. Dan untuk mengetahui spesifik jenis mutasi yang terjadi hanya dapat dilakukan melalui pemeriksaan analisis DNA (Rujito, 2019)
- Adanya mutasi pada kromosom 11 penghasil rantai β mengakibatkan terjadinya ketidak seimbangan jumlah antara rantai α dan β dengan proporsi rantai globin β jumlahnya kurang. Hal tersebut mengakibatkan tidak terbentuknya ikatan dengan rantai globin α sehingga rantai globin α akan mengendap (Angastiniotis & Lobitz, 2019).
- Rantai globin α yang berlebihan akan mengendap pada prekursor sel darah merah, menyebabkan kerusakan oksidatif pada membran, maturasi sel yang tidak normal dan destruksi prematur eritroid di sumsum tulang sehingga terjadi eritropoesis yang tidak efektif (Grosso et al., 2012).
- Selanjutnya terjadi anemia yang ditandai dengan menurunnya Hb dan indeks eritrosit yang rendah (MCV, MCH rendah). Terjadi pula peningkatan penyerapan absorpsi zat besi yang jika zat besi menumpuk pada hati akan mengakibatkan gangguan fungsi hati (Thalassaemia International Federation, 2014).
- Untuk mengetahui proporsi jumlah rantai globin α dan β dapat dilakukan pemeriksaan hemoglobin elektroforesis. Elektroforesis merupakan metode yang paling umum untuk mengevaluasi hemoglobin yang berbeda seperti HbA, HbA2 dan HbS (Devanesan et al., 2019)
- berdasarkan derajat klinis dan kebutuhan transfusi, thalassemia dibagi menjadi dua grup utama yakni *transfusion dependent thalassemia* (TDT) dan *non*

transfusion dependent thalassemia (NTDT) (Thalassaemia International Federation, 2014)

- Transfusion dependent thalassemia membutuhkan transfusi darah regular, dan tanpa transfusi yang adekuat penderita dapat mengalami komplikasi dan masa hidup yang pendek. Yang termasuk ke dalam grup tersebut yakni thalassemia β mayor dan HbE/thalassemia β berat (Thalassaemia International Federation, 2014).

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Jenis dan Rancangan Penelitian

4.1.1 Jenis penelitian

Jenis penelitian ini merupakan penelitian observasional deskriptif karena bertujuan untuk memperoleh gambaran distribusi dan frekuensi polimorfisme genetik penderita thalassemia β .

3.1.2 Rancangan penelitian

Penelitian ini dirancang menggunakan metode observasi, yaitu memeriksa secara langsung jenis mutasi dan melihat frekuensi serta distribusi polimorfisme genetik penderita thalassemia β .

4.2 Populasi Sampel, Teknik pengambilan sampel dan Kriteria Sampel

4.2.1 Populasi

Penderita Thalassemia β di Jawa Timur yang mendapatkan pengobatan di Rumah Sakit Dokter Soetomo Surabaya

4.2.2 Sampel

Anak-anak penderita Thalassemia β yang berusia 5-18 tahun yang rutin mendapatkan transfusi darah di poliklinik anak rumah sakit Dr. Soetomo Surabaya, tidak mendapatkan transfusi dalam 2 minggu terakhir dan tidak menderita penyakit berat sebelumnya.

4.2.3 Teknik pengambilan sampel

Pengambilan darah vena anak penderita thalassemi β oleh tenaga terlatih.

Sebanyak 3 ml darah dimasukkan ke dalam tabung EDTA untuk dilakukan pemeriksaan.

4.2.4 Kriteria Sampel

Sampel yang diambil merupakan darah Vena, tidak lisis , volume simple tidak kurang dari 3 ml.

4.3 Variabel Penelitian

Variabel penelitian dan definisi operasional dibentuk dalam bentuk tabel dibawah ini.

Tabel 4.1. Definisi operasional dan variabel penelitian

<i>Variabel</i>	<i>Definisi operasional</i>	<i>Sumber Data</i>	<i>Alat Ukur</i>	<i>Kriteria</i>	<i>Skala Data</i>
Anak Penderita Thalassemia	Penderita Thalassemia β yang telah terdiagnosis umur 5- 18 tahun	Poli Hematologi Anak	Data Pasien	Nilai: 33 orang	Rasio
Polimorfisme Thalassemia β	Polimorfisme Genetik Thalassemia β	Hasil Pemeriksaan Laboratorium	Sekuensing Sanger	1. IVS1nT1 2. IVS1nT5 3. HbE 4. Lain-lain	Nominal
Hemoglobin Elektroforesis	Fraksi Hemoglobin pada pasien thalassemia yang diperiksa menggunakan hemoglobin electrophoresis analyzer	Hasil Pemeriksaan Laboratorium	Sebia minicapillary [®]	1.HbA 2.HbF 3.HbA2 4.HbBart 5.HbE 6.Lain-lain	Nominal

4.4. Lokasi dan Lama Penelitian

Lokasi: Poli Hematologi Anak Rumah Sakit Dokter Soetomo

Waktu Penelitian: Juli 2021 – Januari 2022

4.5 Peralatan dan Bahan Penelitian

Alat-alat yang dibutuhkan adalah untuk sampling darah vena yakni Sduit 10 ml, tourniquete, kapas alkohol, tabung EDTA, dan APD.

Bahan penelitian adalah darah vena 3 ml dalam tabung EDTA.

Analyzer yang digunakan dalam penelitian ini meliputi hematology analyzer Sysmex XN 1000 (Sysmex Corporation, Kobe, Jepang) untuk pemeriksaan darah lengkap, dan pemeriksaan hemoglobin elektroforesis menggunakan analizer mini capillary (Sebia 9 Hdragel K20 Hemoglobin; Capillary®; Sebia, Lisses).

Untuk pemeriksaan analisis DNA menggunakan sampel darah yang sama dengan reagen ekstraksi DNA dari QIAamp® DNA Blood Mini Kit lot No. 166051764 (Qiagen GmbH, Hilden, Germany. Pemeriksaan mutasi genetik menggunakan sekuensing metode Sanger di laboratorium genetika terpadu universitas Gajah Mada Yogyakarta.

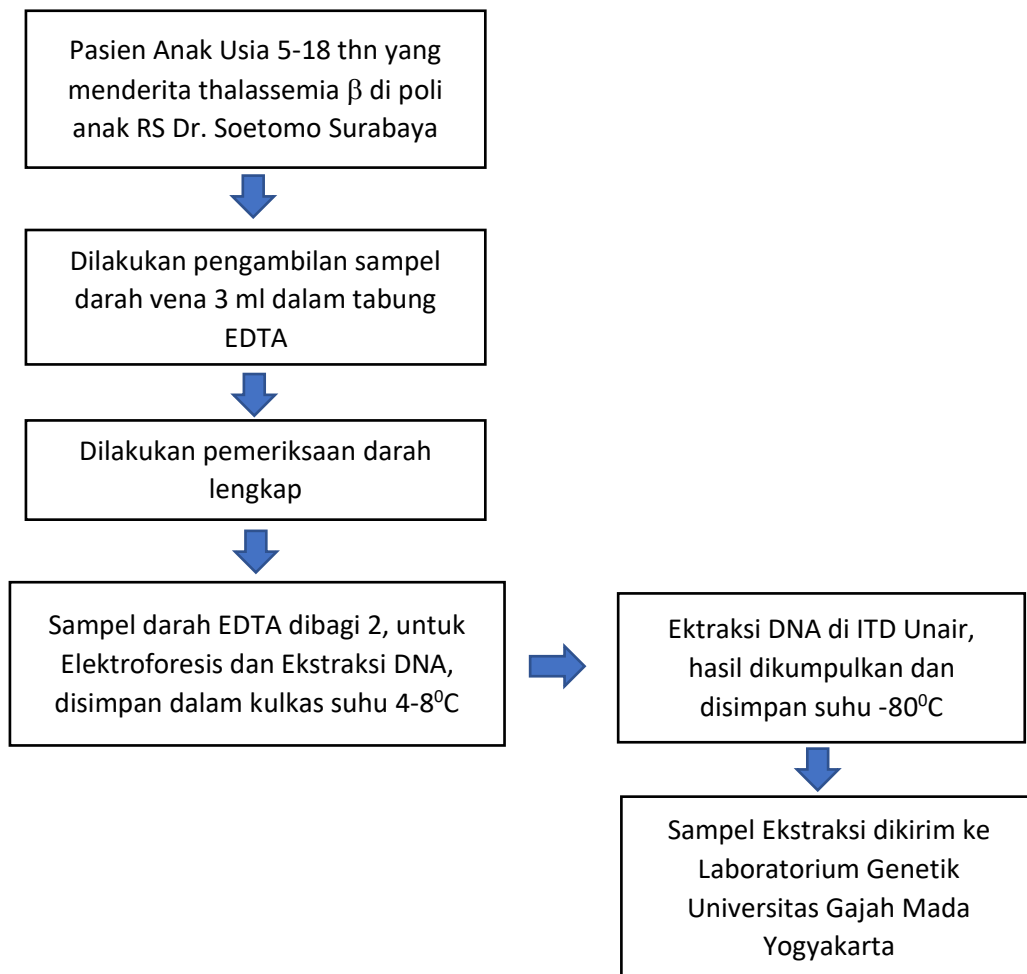
4.6 Prosedur Penelitian

Setelah pengambilan sampel darah vena subjek sebanyak 3 ml dalam tabung EDTA, dilakukan pemeriksaan hematologi lengkap menggunakan alat hematologi analizer otomatis Sysmex XN 1000. Setelah itu, sebagian sampel dibagi untuk dilakukan pemeriksaan elektroforesis hemoglobin dan ekstraksi DNA. Sebelum dilakukan pemeriksaan hemoglobin elektroforesis dan ekstraksi, sample disimpan di kulkas suhu 4-8⁰C.

Tahap awal pemeriksaan analisis mutasi adalah melakukan ekstrasi DNA dari leukosit darah pasien. Ekstraksi DNA dilakukan di ITD Unair

Sampel DNA dikumpul dan disimpan pada suhu -80°C sebelum dilakukan pemeriksaan lebih lanjut. Berikutnya sampel DNA dikirim menggunakan kurir ke Laboratorium Genetik Universitas Gajah Mada Yogyakarta untuk dilakukan pemeriksaan Genetik Thalassemia.

4.7 Skema Alur Penelitian



Gambar 4.1. Skema Alur Penelitian

4.8 Analisis

Analisis data berupa gambaran distribusi mutasi genetik penderita thalassemia

4.9 Etik

Subjek penelitian yang diikutkan dalam penelitian ini telah mendapat persetujuan tertulis dari orang tua atau keluarga penderita. Formulir informed consent dapat dilihat di lampiran. Kelaikan etik penelitian telah diperoleh dari Komite Etik Penelitian Kesehatan, RSUD Dr. Soetomo Surabaya dengan nomer etik 0224/KEPK/VII/2021.

BAB 5

HASIL PENELITIAN

Jumlah keseluruhan subjek yang direkrut pada penelitian ini sebanyak 33 orang dengan rentang usia 5-17 tahun yang terdiri dari 19 subjek berjenis kelamin perempuan (58%) dan 14 subjek laki-laki (42%). Subjek dengan suku Jawa (91%) merupakan mayoritas, selebihnya merupakan keturunan Cina (9%) (Tabel 1).

Tabel 5.1. Data Demografik Subjek (n=33)

Demografi	n (%)
Jenis Kelamin	
Laki-laki	14 (42)
Perempuan	19 (58)
Usia	
5-9	10 (30)
10-14	18 (55)
15-18	5 (15)
Suku	
Jawa	30 (91)
Lainnya	3 (9)

Pada pemeriksaan analisis hemoglobin elektroforesis, sebagian besar subjek menderita Hb E / Thalassemia β (85%) (Tabel 2).

Tabel 5.2. Hasil Analisis Hemoglobin Elektroforesis

Analisis Hemoglobin Elektrophoresis	n (%)
Beta Thalassemia	5 (15)
Hb E / Thalassemia β	28 (85)

Dari hasil pemeriksaan genetik menggunakan PCR dan dilanjutkan dengan pemeriksaan sekuensing menggunakan metode Sanger, didapatkan sebanyak 12 jenis mutasi pada rantai

globin β dengan jumlah mutasi terbanyak adalah mutasi $\beta^{CD26}/\beta^{IVS-I-5}$ sebanyak 12 subjek (36.4%), diikuti oleh mutasi $\beta^{CD26}/\beta^{CD35}$ sebanyak 6 subjek (18.2%). Terdapat satu subjek yang tidak terdeteksi mutasinya secara sekuensing (Tabel 3).

Tabel 5.3. Hasil Pemeriksaan mutasi genetik menggunakan Sekuensing Sanger

No	Genotip	Jumlah subjek	Frekuensi (%)
1	$\beta^{CD26}/\beta^{IVS-I-5}$	12	36.4
2	$\beta^{CD26}/\beta^{CD35}$	6	18.2
3	$\beta^{CD26}/\beta^{IVS-I-2}$	3	9.1
4	$\beta^{CD26}/\beta^{IVS-I-1}$	1	3
5	$\beta^{IVS-I-5}/\beta^{CAP+1}$	1	3
6	$\beta^{IVS-I-5}/\beta^{CD35}$	1	3
7	$\beta^{CD26}/\beta^{CD37}$	1	3
8	$\beta^{CD26}/\beta^{CD15}$	1	3
9	$\beta^{CD27/28}/\beta^{CD40}$	2	6.1
10	$\beta^{CD26}/\beta^{CD40}$	1	3
11	$\beta^{IVS-I-5}/\beta^{CD19}$	1	3
12	$\beta^{IVS-I-1}/\beta^{CAP+1}$	2	6.1

Profil hasil laboratorium pemeriksaan hematologi, fungsi hati dan fungsi ginjal disajikan dalam tabel 4

Tabel 5.4. Hasil pemeriksaan laboratorium hematologi, fungsi hati, fungsi ginjal subjek

Parameter	Nilai
Hematologi	Mean \pm SD (min – max)
Hemoglobin (g/dL)	8.12 \pm 0.70 (6.80-9.60)
RBC ($\times 10^9/L$)	3.40 \pm 0.39 (2.62-4.30)
MCV (fL)	71.05 \pm 5.72 (60.00-86.30)
MCH (pg)	24.12 \pm 2.45 (19.50-29.00)

MCHC (g/dL)	33.91 ± 1.47 (31.80-37.80)
RDW-CV	24.38 ± 6.02 (14.60-37.60)
WBC (x10 ³ /L)	7.01 ± 1.98 (4.11-11.97)
PLT (x10 ³ /L)	294.82 ± 138.65 (84.00-765.00)
Kimia Klinik	
Ferritin (ng/mL)	2564.39 ± 1616.40 (218.70-7109.30)
Serum glutamic oxaloacetic transaminase (SGOT) (U/L)	44.61 ± 24.26 (20.00-128.00)
Serum glutamic pyruvic transaminase (SGPT) (U/L)	39.52 ± 33.06 (12.00-149.00)
Blood Urea Nitrogen (BUN) (mg/dL)	9.12 ± 3.02 (2.00-16.00)
Serum Creatinine (mg/dL)	0.38 ± 0.11 (0.10-0.60)

Kadar hemoglobin subjek rata-rata adalah 8.12 g/dL, dengan indeks eritrosit rata-rata yang rendah (MCV 71.05 fl, MCH 24.12 pg, MCHC 33.91 g/dL), hasil ini sesuai dengan gambaran penderita thalassemia.

Terdapat sedikit peningkatan rata-rata fungsi hati yakni nilai SGOT dan SGPT (44.61 U/L dan 39.52 U/L) pada subjek penelitian dengan kadar rata-rata fungsi ginjal yang masih normal (BUN 9.12 mg/dL, Serum kreatinin 0.38 mg/dL)

BAB 6

PEMBAHASAN

Pada penelitian ini didapatkan subjek penderita thalassemia β yang berobat ke rumah sakit Dr. Soetomo Surabaya mengalami mutasi pada $\beta^{CD26}/\beta^{IVS-1-5}$ sebanyak 36.4% dengan gambaran hasil pemeriksaan elektroforesis hemoglobin didapatkan Hb E / Thalassemia β (85%). Hasil penelitian ini tidak jauh berbeda dengan hasil penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Hernanda et al, 2012 pada studi yang dilakukan di Jawa Timur. Sebanyak 17 pasien thalassemia *transfusion dependent* yang berobat di rumah sakit dr Soetomo Surabaya, didapatkan genotip Hb E / Thalassemia β pada 16 kasus (94.1%), dengan mutasi pada 34 kromosom didapatkan terbanyak adalah Hb E (47%) dan IVS1-5 (20.6%) (Hernanda et al., 2012).

Penelitian oleh Rujito et al, 2015, pada 209 subjek pasien thalassemia yang rutin dan tidak rutin mendapatkan transfuse darah di daerah Banyumas, Jawa Tengah, didapatkan hasil terbanyak pada mutasi Cd26/IVS 1-5 dengan frekuensi 40.67% (Rujito et al., 2015a)

Hasil yang serupa dengan penelitian ini juga berasal dari penelitian yang dilakukan oleh Susanto et al, 2020, pada 31 pasien thalassemia β di kota Samarinda, Kalimantan Timur. Didapatkan alel mutan yang terbanyak adalah Cd26/HbE (GAG>AAG) 48%, IVS 1-5 (G>C) 14.5%. Suku yang terbanyak pada penelitian tersebut merupakan suku Jawa (64.5%) (Susanto et al., 2020)

Studi yang dilakukan di Daerah Istimewa Yogyakarta oleh Handayani et al, 2020 pada 28 subjek yang diduga menderita thalassemia β , mendapatkan hasil yang sedikit berbeda. Penelitian tersebut mendapati mutasi pada IVS 1-5 (G>C) adalah yang terbanyak (71.4%),

selanjutnya IVS 1-2 (T>C) dan IVS 1-1 (G>T) (masing-masing 7.1% dan 3.6%) (Handayani et al., 2020).

Hasil Penelitian yang berbeda selanjutnya berasal dari penelitian yang dilakukan Adhiyanto et al, 2017 pada 100 subjek siswa sekolah usia 12-18 tahun di Malang. Didapatkan mutasi yang paling banyak adalah Cd2 (T>C) dan IVS 2-16 (G>C) (Adhiyanto et al., 2017). Meskipun berada dalam satu kepulauan yakni pulau Jawa, hasil pemeriksaan mutasi pada rantai globin β di daerah Istimewa Yogyakarta oleh Handayani et al, 2020 dan Adhiyanto et al, 2017 di Malang tidak sama seperti yang didapatkan pada penelitian ini. Perbedaan hasil kedua penelitian tersebut dari hasil penelitian ini kemungkinan akibat dari pengambilan sampel subjek yang diduga menderita thalassemia atau thalassemia karier yang tergolong ringan dan kadang tidak bergejala. Pada penelitian ini, serta penelitian oleh Hernanda et al, 2012 dan penelitian oleh Susanto et al, 2020 yang mengambil subjek dari pasien yang sudah didiagnosis thalassemia, mendapatkan hasil yang serupa dengan kesamaan subjek pada mayoritas adalah suku Jawa. Dibutuhkan penelitian lebih banyak mengenai jenis mutasi penderita thalassemia β di Indonesia, mengingat Indonesia adalah negara kepulauan yang terdiri dari berbagai macam suku sehingga kemungkinan jenis mutasi yang terjadi tidak sama antar suku. Meskipun secara mayoritas suku Jawa adalah suku yang terbanyak, sekitar 40.2% atau 95.2 juta jiwa dan telah menyebar ke seluruh Indonesia (Na'im & Syaputra, 2011).

Mutasi pada IVS1-5 dan Cd26 (HbE) tampaknya berkaitan dengan terjadinya thalassemia β *transfusion dependent*. Seperti halnya pada penelitian ini yang mengikutsertakan subjek yang rutin mendapatkan transfuse di rumah sakit Dr. Soetomo Surabaya, pada hasil pemeriksaan mutasi didapatkan genotype $\beta^{CD26}/\beta^{IVS-I-5}$ sebanyak 36.4% dari 33 subjek. Hasil ini dikuatkan oleh penelitian Shrivastava et al, 2019 dan Christoper, et al. 2013.

Penelitian oleh Shrivastava et.al, 2019, pada 62 pasien thalassemia β *transfusion dependent*, didapatkan mutasi yang umum terjadi di India adalah IVS1-5 (G-C) (46%), IVS1-

1 (G-T) (12%), Cd41/42 (-TTCTT), delesi 619 bp (9%), Cd8/9 (+G) (7%) (Shrivastava et al., 2019).

Mutasi yang sama, yakni IVS1-5 (G-C) dan Cd26 (G-A) (HbE) pada pasien thalassemia β *transfusion dependent* ditemukan di Uttar Pradesh bagian barat oleh Christopher et al. 2013. Sebanyak 48 sample darah dikumpulkan dan dianalisa menggunakan metode ARMS-PCR (Christopher et al., 2013).

Penelitian kami menemukan rata-rata kadar feritin subjek 2564 ng/mL. Peningkatan feritin dapat disebabkan oleh banyak faktor, dan dari penderita thalassemia dengan transfusi teratur salah satunya adalah deposisi besi. Transfusi darah biasa, yaitu satu unit 420 mL darah donor mengandung kira-kira 200 mg zat besi, atau 0,47 mg/mL darah donor utuh. Skema Transfusi yang direkomendasikan untuk thalassemia mayor dalam buku Pedoman *Transfusion Dependent Thalassemia* (TDT), sekitar 100-200 sel darah merah murni (RBC) per kg berat badan per tahun ditransfusikan atau 116-232 mg besi/kg berat badan/tahun. Dan sekitar 0,32-0,64 mg/kg setiap hari (Thalassaemia International Federation, 2014). Dalam penelitian ini, hampir semua subjek memiliki nilai Ferritin tinggi sedangkan satu subjek memiliki feritin normal (218,7 ng/mL). Subjek ini telah didiagnosis thalassemia beberapa bulan sebelum penelitian kami dimulai dan telah menjalani transfusi darah sekitar sebulan sekali, menunjukkan bahwa pasien yang ditransfusikan secara teratur berada dalam status kelebihan zat besi.

Deposisi besi dapat mempengaruhi organ yang berbeda di TDT dan NTDT, karena mekanisme pemuatan besi yang mendasari dan tingkat akumulasi besi. Pengukuran feritin serum dan teknik pencitraan non-invasif tersedia untuk mendiagnosis kelebihan zat besi, mengukur tingkatnya di berbagai organ dan memantau respons klinis terhadap terapi (Taher & Saliba, 2017). Ketika disimpan dalam sel retikuloendotelial, besi kurang beracun. Segera setelah kelebihan zat besi hepatositik terjadi, hal itu dapat merusak hepatosit yang menyebabkan

nekrosis seluler (meningkatkan transaminase serum) diikuti dengan perkembangan jaringan parut (fibrosis) yang progresif (Thalassaemia International Federation, 2014).

Konsisten dengan penelitian Moshary et al.2020, ditemukan ada korelasi positif antara feritin serum dan SGPT, SGOT dan Alkaline Phospatase (ALP) pada pasien thalassemia *transfusion dependent* (TDT) (Al-Moshary et al., 2020). Studi lain yang membandingkan antara nilai feritin pada kelompok enzim hati normal (SGPT, SGOT) dan kelompok peningkatan enzim hati, menunjukkan rata-rata kadar feritin serum secara signifikan lebih tinggi pada pasien kelompok peningkatan enzim hati SGPT dan atau SGOT dibandingkan dengan kelompok kadar enzim hati normal (Salama et al., 2015).

BAB 7

PENUTUP

7.1 Kesimpulan

- Terdapat 12 jenis mutasi yang terdeteksi pada penelitian ini, yakni $\beta^{CD26/\beta^{IVS-I-5}}$, $\beta^{CD26/\beta^{CD35}}$, $\beta^{CD26/\beta^{IVS-I-2}}$, $\beta^{CD26/\beta^{IVS-I-1}}$, $\beta^{IVS-I-5/\beta^{CAP+1}}$, $\beta^{IVS-I-5/\beta^{CD35}}$, $\beta^{CD26/\beta^{CD37}}$, $\beta^{CD26/\beta^{CD15}}$, $\beta^{CD27/28/\beta^{CD40}}$, $\beta^{CD26/\beta^{CD40}}$, $\beta^{IVS-I-5/\beta^{CD19}}$ dan $\beta^{IVS-I-1/\beta^{CAP+1}}$
- Hasil Penelitian ini mendukung hasil penelitian sebelumnya yang dilakukan di rumah sakit dr Soetomo Surabaya terhadap pasien thalassemia β yang rutin mendapatkan transfuse darah didapatkan mayoritas mengalami mutasi pada CD26 dan IVS-I-5.
- Hasil mutasi genetik yang berbeda menyebabkan gejala klinis yang berbeda derajat keparahannya, dimana pada penelitian ini subjek yang diikutsertakan adalah penderita thalassemia β *transfusion dependent* yang mengalami mutasi pada CD26 dan IVS-I-5, hasil tersebut konsisten dengan penelitian lain seperti pada penelitian yang dilakukan di Kalimantan dan negara India.
- Pada pemeriksaan elektroforesis hemoglobin subjek yang merupakan penderita thalassemia β *transfusion dependent*, didapatkan yang terbanyak mengalami Hb E/thalassemia β .
- Pada pemeriksaan darah lengkap subjek didapatkan indeks eritrosit yang sesuai pada gambaran penderita thalassemia yakni nilai MCV, MCH dan MCHC yang rendah
- Penderita thalassemia β *transfusion dependent* cepat mengalami kelebihan zat besi, hal ini sesuai dengan hasil pemeriksaan rata-rata ferritin subjek penelitian yang cukup tinggi 2564 ng/mL

- Terdapat sedikit peningkatan rata-rata fungsi hati pada subjek yakni nilai SGOT dan SGPT (44.61 U/L dan 39.52 U/L) yang diyakini berkaitan dengan peningkatan kadar zat besi oleh karena transfuse berulang
- Suku Jawa merupakan suku yang dominan pada penelitian oleh karena populasi suku Jawa merupakan yang paling banyak di Jawa Timur dan bahkan di Indonesia.

7.2 Saran

- Peningkatan kadar zat besi pada subjek sebaiknya juga dikaitkan dengan lamanya masa subjek menerima transfuse sehingga didapatkan data yang lebih akurat.
- Pencatatan usia saat awal didiagnosis menderita thalassemia β akan lebih menggambarkan kaitan antara terjadinya mutasi dan berat ringannya penyakit
- Sebaiknya dilakukan pengukuran status indeks massa tubuh subjek dan tumbuh kembangnya oleh karena penderita thalassemia β akan terpengaruh dalam hal tumbuh kembang
- Sampel yang lebih banyak akan menggambarkan variasi polimorfisme yang lebih beragam yang akan lebih menggambarkan populasi penderita thalassemia β untuk wilayah Jawa Timur.

DAFTAR PUSTAKA

- Adhiyanto, C., Susianti, Y., Rahmawati, N. M., Badriah, F., Harriati, Z., Raisha, Putri, A. R., & Nurvitasari, A. (2017). Screening of Beta-globin gene mutations in adolescent schoolgirls in rural Malang and Sukabumi city , Java Province , Indonesia. *Atlantis Press, 10*(ICHLAS), 183–186. <https://doi.org/10.2991/ichlas-17.2017.47>
- Al-Moshary, M., Imtiaz, N., Al-Mussaed, E., Khan, A., Ahmad, S., & Albqami, S. (2020). Clinical and Biochemical Assessment of Liver Function Test and Its Correlation with Serum Ferritin Levels in Transfusion-dependent Thalassemia Patients. *Cureus, 12*(4). <https://doi.org/10.7759/cureus.7574>
- Angastiniotis, M., & Lobitz, S. (2019). Thalassemias: An overview. In *International Journal of Neonatal Screening* (Vol. 5, Issue 1). MDPI Multidisciplinary Digital Publishing Institute. <https://doi.org/10.3390/ijns5010016>
- Bajwa, H., & Basit, H. (2022). *Thalassemia*. StatPearls Publishing LLC. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK545151/?report=reader#_NBK545151_pubdet_
- BPJS Kesehatan RI. (2021). Penyakit katastrofik berbiaya mahal. *Edisi 104*, 6–9. <https://bpjs-kesehatan.go.id/bpjs/dmdocuments/ae3544d7f3382ebb639eba99192b5c76.pdf>
- Brancaleoni, V., di Pierro, E., Motta, I., & Cappellini, M. D. (2016). Laboratory diagnosis of thalassemia. *International Journal of Laboratory Hematology, 38*, 32–40. <https://doi.org/10.1111/ijlh.12527>
- Cao, A., & Galanello, R. (2010). Beta-thalassemia. *Genetics in Medicine, 12*(2), 61–76. <https://doi.org/10.1097/GIM.0b013e3181cd68ed>
- Cao, A., & Kan, Y. W. (2013). The Prevention of Thalassemia. *Cold Spring Harb Perspect Med, 3*(2), 1–15. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a011775>
- CDC. (2015). Hemoglobinopathies : Current Practices for Screening , Confirmation and Follow-up. *Association of Public Health Laboratories, December*, 5–57.
- Christopher, A. F., Kumari, A., Chaudhary, S., Hora, S., Ali, Z., Agrawal, S., & Christopher, A. (2013). Unique pattern of mutations in β -thalassemia patients in Western Uttar Pradesh. *Indian Journal of Human Genetics, 19*(2), 207. <https://doi.org/10.4103/0971-6866.116119>
- Devanesan, S., AlQahtani, F., AlSalhi, M. S., Jeyaprakash, K., & Masilamani, V. (2019). Diagnosis of thalassemia using fluorescence spectroscopy, auto-analyzer, and hemoglobin electrophoresis — A prospective study. *Journal of Infection and Public Health, 12*(4), 585–590. <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2019.02.018>
- Do, V., & Tran, H. (2014). The Thalassemias. In *Reference Module in Biomedical Science*. (pp. 1–6). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.05342-3>
- Farashi, S., & Hartevelde, C. L. (2018). Molecular basis of α -thalassemia. In *Blood Cells, Molecules, and Diseases* (Vol. 70, pp. 43–53). Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/j.bcnd.2017.09.004>

- Farid, Y., Bowman, N. S., & Lecat, P. (2021). Biochemistry, Hemoglobin Synthesis. [Updated 2021 May 9]. In *StatPearls (Internet)*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK536912/#_NBK536912_pubdet_
- Grosso, M., Sessa, R., Puzone, S., Storino, M. R., & Izzo, P. (2012). Molecular basis of Thalassemia. In D. S. Silverberg (Ed.), *Anemia* (pp. 341–358). <https://doi.org/10.5772/31362>
- Handayani, N. S. N., Husna, N., Rahmil, G., Ghifari, R. A., Widyawati, L., & Lesmana, I. (2020). Splice-site and Frameshift Mutations of β -Globin Gene Found in Thalassemia Carrier Screening in Yogyakarta Special Region, Indonesia. *The Indonesian Biomedical Journal*, *13*(1), 55–60. <https://doi.org/10.18585/inabj.v13i1.1406>
- Harteveld, C. L., & Higgs, D. R. (2010). α -thalassaemia. In *Orphanet Journal of Rare Diseases* (Vol. 5, Issue 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/1750-1172-5-13>
- Hernanda, P. Y., Tursilowati, L., Arkesteijn, S. G. J., Ugrasena, I. D. G., Larasati, M. C. S., Soeatmadji, S. M., Giordano, P. C., & Harteveld, C. L. (2012). Towards a prevention program for β -thalassemia. the molecular spectrum in East Java, Indonesia. *Hemoglobin*, *36*(1), 1–6. <https://doi.org/10.3109/03630269.2011.642914>
- Huang, T. L., Zhang, T. Y., Song, C. Y., Lin, Y. B., Sang, B. H., Lei, Q. L., Lv, Y., Yang, C. H., Li, N., Tian, X., Yang, Y. H., & Zhang, X. W. (2020). Gene Mutation Spectrum of Thalassemia Among Children in Yunnan Province. *Frontiers in Pediatrics*, *8*(April), 1–5. <https://doi.org/10.3389/fped.2020.00159>
- Pedoman Nasional Pelayanan Kedokteran Tata laksana Thalassemia, Pub. L. No. HK.01.07/MENKES/I/2018 (2018).
- Munkongdee, T., Chen, P., Winichagoon, P., Fucharoen, S., & Paiboonsukwong, K. (2020). Update in Laboratory Diagnosis of Thalassemia. *Frontiers in Molecular Biosciences*, *7*(May), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2020.00074>
- Na'im, A., & Syaputra, H. (2011). Kewarganegaraan, Suku Bangsa, Agama dan Bahasa Sehari-hari Penduduk Indonesia. Hasil Sensus Penduduk 2010. In Sumarwanto & T. Iriantono (Eds.), *ⓂⓂⓂⓂⓂⓂ: Vol. ⓂⓂⓂⓂ Ⓜ* (Issue *ثقفثق ثق*). Badan Pusat Statistik, Jakarta-Indonesia.
- Origa, R. (2017). β -Thalassemia. *Genetics in Medicine*, *19*(6), 609–619. <https://doi.org/10.1038/gim.2016.173>
- Rujito, L. (2019). *Buku Referensi Talasemia : Genetik Dasar dan Pengelolaan Terkini* (W. Siswandari & D. W. D. Lestari, Eds.; First). Universitas Jenderal Soedirman.
- Rujito, L., Basalamah, M., Mulatsih, S., & Sofro, A. S. M. (2015a). Molecular Scanning of β -Thalassemia in the Southern Region of Central Java, Indonesia; a Step Towards a Local Prevention Program. *Hemoglobin*, *39*(5), 330–333. <https://doi.org/10.3109/03630269.2015.1065420>
- Rujito, L., Basalamah, M., Mulatsih, S., & Sofro, A. S. M. (2015b). Molecular Scanning of β -Thalassemia in the Southern Region of Central Java, Indonesia; a Step Towards a Local Prevention Program. *Hemoglobin*, *39*(5), 330–333. <https://doi.org/10.3109/03630269.2015.1065420>
- Salama, K. M., Ibrahim, O. M., Kaddah, A. M., Boseila, S., Ismail, L. A., & Abdel Hamid, M. M. (2015). Liver enzymes in children with beta-Thalassemia major: Correlation with iron overload and viral

- hepatitis. *Macedonian Journal of Medical Sciences*, 3(2), 287–292.
<https://doi.org/10.3889/oamjms.2015.059>
- Sankaran, V. G., & Orkin, S. H. (2013). The switch from fetal to adult hemoglobin. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 3(1). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a011643>
- Setianingsih, I., Williamson, R., Marzuk, S., Harahap, A., Tamam, M., & Forrest, S. (1998). Molecular Basis of [3-Thalassemia in Indonesia: Application to Prenatal Diagnosis. In *Molecular Diagnosis* (Vol. 3, Issue 1).
- Shang, X., & Xu, X. (2017). Update in the genetics of thalassemia: What clinicians need to know. In *Best Practice and Research: Clinical Obstetrics and Gynaecology* (Vol. 39, pp. 3–15). Bailliere Tindall Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.bpobgyn.2016.10.012>
- Shrivastava, M., Bathri, R., & Chatterjee, N. (2019). Mutational analysis of thalassemia in transfusion-dependent beta thalassemia patients from central India. *Asian Journal of Transfusion Science*, 13(2), 105–109. https://doi.org/10.4103/ajts.AJTS_115_18
- Susanto, Z. A., Siswandari, W., & Rujito, L. (2020). Cd60 (GTG > GAG)/Hb Cagliari mutation was found in scanning of β -thalassemia alleles from patients of East Kalimantan, Indonesia. *Molecular Genetics and Metabolism Reports*, 22, 1–3. <https://doi.org/10.1016/j.ymgmr.2019.100550>
- Taher, A. T., & Saliba, A. N. (2017). Iron overload in thalassemia: Different organs at different rates. *Hematology*, 2017(1), 265–271. <https://doi.org/10.1182/asheducation-2017.1.265>
- Thalassaemia International Federation. (2014). *GUIDELINES FOR THE MANAGEMENT OF TRANSFUSION DEPENDENT GUIDELINES FOR THE MANAGEMENT OF TRANSFUSION DEPENDENT* (M. Cappellini, A. Cohen, J. Porter, A. Taher, & V. Viprakasit, Eds.; 3rd ed., Issue 20). Thalassaemia International Federation. <https://thalassaemia.org.cy/download/guidelines-for-the-management-of-transfusion-dependent-thalassaemia-3rd-edition-2014-english/>
- Thein, S. L. (2013). The molecular basis of β -thalassemia. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 3(5). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a011700>
- Thein, S. L. (2018). Molecular basis of β thalassemia and potential therapeutic targets. In *Blood Cells, Molecules, and Diseases* (Vol. 70, pp. 54–65). Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/j.bcmd.2017.06.001>
- Wahidiyat, P. A., Sari, T. T., Rahmartani, L. D., Setianingsih, I., Iskandar, S. D., Pratanata, A. M., Yapiy, I., Yosia, M., & Tricta, F. (2020). An insight into Indonesian current thalassaemia care and challenges. *ISBT Science Series*, 15(3), 334–341. <https://doi.org/10.1111/voxs.12544>