

# PENGHITUNGAN INDEKS FORMULA ERITROSIT PADA UJI SARING THALASEMIA MINOR

Eva Ayu Maharani, Dewi Astuti

Jurusan Analis Kesehatan Poltekkes Kemenkes Jakarta III

Jl. Arteri JORR Jatiwarna Kec. Pondok Melati - Bekasi

Email : eva\_ankes@yahoo.com

## ABSTRACT

*Thalassemia is a genetic disorder caused by impaired synthesis of globin chains in hemoglobin (Hb) molecule which can be partial or total. Since thalassemia is inherited from parents to their children, screening is compulsory to prevent newborn at risk from major thalassemia. The incidence thalassemia cases can be found around the world but majority cases emerge among Mediterranean, easter, and Asian. Thalassemia minor is diagnosed based on erythrocyte indices and confirmed by molecular analysis of Hb and DNA. Currently, several formulas are developed to identify the existence of thalassemia. This cross sectional study was aimed to know how good the formulas is. Thalassemia screening was done to 138 donors with minimum of Hb 12,5 g/dL. Detection and identification proses was conducted by the use of calculation index formulas for erythrocytes namely Mentzer index, Srivastava, Shine & Lal, and England & Fraser. The results showed that all of four indexes can detect ? thalassemia minor. The highest degree of sensitivity is Mentzer and Shine & Lal indexes (100%), whereas the highest specificity is Srivastava index (100%). In addition, ? thalassemia and Hb variant (HbE) can also be detected, although not 100%. This result shows that the formulas can be used as a screening of thalassemia, especially in areas those have no access to molecular laboratory.*

*Keywords: thalassemia minor, index formula erythrocytes, screening*

## ABSTRAK

*Thalassemia merupakan kelainan genetik berupa gangguan sintesis rantai globin pada molekul hemoglobin (Hb) baik sebagian (parsial) maupun total. Kelainan ini bersifat herediter yaitu bisa diturunkan dari orang tua kepada anaknya, sehingga tindakan pencegahan merupakan langkah yang harus dilakukan sebelum terjadi kelahiran dengan thalassemia mayor. Penderita thalassemia terdistribusi di seluruh dunia, namun lebih banyak ditemukan pada populasi Mediterania, Timur Tengah, dan Asia Tenggara. Diagnosis thalassemia dilakukan berdasarkan parameter hematologi, analisis Hb dan analisis DNA sebagai pemeriksaan konfirmasi. Saat ini telah dikembangkan beberapa formula penghitungan untuk deteksi thalassemia. Penelitian ini bertujuan untuk melihat seberapa baik formula tersebut dalam mendeteksi thalassemia minor. Skrining dilakukan pada 138 donor dengan kriteria inklusi yaitu konsentrasi Hb minimal 12,5 g/dL. Hasil diagnosis thalassemia dibandingkan dengan penghitungan indeks formula eritrosit yaitu indeks Mentzer, Srivastava, Shine & Lal, England & Fraser. Hasil penelitian menunjukkan keempat indeks dapat mendeteksi thalassemia ? minor. Derajat sensitifitas tertinggi, indeks Mentzer dan Shine & Lal (100%), sedangkan spesifisitas tertinggi didapat pada indeks Srivastava (100%). Disamping itu, thalassemia ? dan Hb varian (HbE) juga dapat terdeteksi walaupun tidak 100%. Hal ini menunjukkan formula tersebut dapat digunakan sebagai skrining thalassemia khususnya pada wilayah yang tidak mempunyai akses pemeriksaan molekuler.*

*Kata kunci : thalassemia minor, indeks formula eritrosit, skrining*

## PENDAHULUAN

Thalasemia merupakan salah satu jenis kelainan darah yang disebabkan oleh gangguan sintesis rantai globin pada hemoglobin (Hb) karena adanya kelainan genetik pada gen globin (Bain, 2006). Gangguan tersebut disebabkan oleh mutasi dan atau delesi pada gen-gen yang mengkode rantai-rantai globin penyusun Hb. Jika kelainan tersebut terjadi pada gen globin  $\alpha$  maka disebut sebagai thalasemia  $\alpha$ , sedangkan jika mutasi tersebut terjadi pada gen globin  $\beta$ , maka disebut sebagai thalasemia  $\beta$  (Kohne, 2011). Pada individu dewasa normal, molekul Hb yang bersifat dominan adalah HbA1 yang tersusun dari dua pasang rantai globin yang berbeda yaitu dua rantai globin  $\beta$  dan dua rantai globin  $\beta$ . Rantai globin tersebut disintesis oleh gen-gen yang berbeda. Rantai globin disintesis oleh dua gen globin  $\beta$  pada setiap kromosom 16 dan rantai globin  $\beta$  oleh satu gen globin  $\beta$  pada setiap kromosom 11 (Higgs & Weatherall, 2009; Sacher & McPherson, 2004).

Kelainan thalasemia ditandai dengan penurunan kecepatan produksi rantai globin, yang dapat mempengaruhi kualitas sel darah merah (Sacher & McPherson, 2004). Kondisi tersebut dapat mengakibatkan pengurangan konsentrasi Hb dan penghancuran sel darah merah secara cepat, sehingga dapat terjadi anemia, yang akan mengganggu pengiriman oksigen ke jaringan tubuh (Ahmed, et al. 2007; Rogers, 2011). Seperti diketahui, fungsi utama molekul Hb adalah membawa dan menyebarkan oksigen ke seluruh jaringan tubuh (Bain, 2006).

Gejala klinis yang ditimbulkan pada penderita bervariasi, mulai dari tanpa gejala klinis pada pembawa sifat/karier (thalasemia minor), gejala anemia ringan sampai sedang (thalasemia intermedia), dan gejala anemia berat sehingga bergantung pada transfusi darah (*blood transfusion dependent thalassemia*)

bahkan bisa menyebabkan kematian pada janin atau bayi baru lahir (*Hydrops foetalis*), pada thalasemia  $\alpha$  mayor (Au & Liang, 2007).

Derajat berat manifestasi klinis yang timbul tergantung dari jenis mutasi pada gen globin dan genotipnya (Muncie & Campbell, 2009).

Penderita thalasemia tersebar luas di berbagai tempat di dunia dan yang paling utama terjadi di daerah Asia Tenggara dan Cina (Ahmed, et al. 2007). Wilayah Asia Tenggara termasuk Thailand dan Indonesia, terdata 50% individu dengan thalasemia minor dari total populasi dunia, sedangkan wilayah Eropa dan Amerika hanya terdapat 10-13% pembawa dari total populasi dunia (Rathod, et al. 2007). Thalasemia merupakan kelainan bawaan yang bersifat autosom resesif, sehingga jika pembawa sifat / penderita thalasemia minor menikah dengan sesama pembawa sifat, maka pasangan ini berpotensi melahirkan penderita thalasemia. Pada penderita thalasemia minor, lebih banyak yang tidak mengetahui atau peduli terhadap status pembawa sifatnya. Hal ini dikarenakan pada penderita thalasemia minor tidak menunjukkan gejala klinis dan konsentrasi Hb cenderung normal (Rogers, 2011).

Kurangnya pengetahuan dan kepedulian masyarakat terhadap status pembawa sifat thalasemia tersebut menjadi penyebab meningkatnya prevalensi lahir penderita thalasemia (Bain, 2006). Deteksi dini dan edukasi pada pembawa gen thalasemia perlu dilakukan untuk mencegah lahirnya penderita thalasemia mayor yang berasal dari kedua orang tua dengan thalasemia minor (Rathod, et al. 2007). Pendekatan terapi yang dilakukan pada penderita thalasemia mayor adalah dengan meningkatkan kualitas penanganan, perawatan dan pengobatan pasien untuk peningkatan kualitas hidup dan menurunkan angka kesakitan (Au & Liang, 2007).

Pada Negara yang sudah melakukan kebijakan

pengecahan talasemia, seperti di Hongkong, pemeriksaan prenatal (sebelum melahirkan) dan diagnosis terhadap talasemia sudah dilakukan. Langkah ini didahului dengan kepedulian masyarakat dan program konseling terkait pola pewarisan talasemia. Deteksi dini yang dilakukan meliputi pemeriksaan gambaran sel darah merah yang dilanjutkan dengan pemeriksaan elektroforesis Hb. Pemeriksaan ini dapat mengidentifikasi talasemia  $\alpha$  dan  $\beta$  minor secara umum (Au & Liang, 2007).

Sampai saat ini, parameter yang paling baik digunakan untuk mendeteksi talasemia adalah hematologi yaitu pengukuran indeks sel darah merah sebagai deteksi dini dan pendekatan molekular yaitu analisis Hb dengan metode *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC) dan analisis DNA sebagai pemeriksaan konfirmasi (Rathod, et al. 2007). Analisis Hb dan analisis DNA merupakan metode standart untuk mendeteksi talasemia, tetapi metode ini tidak rutin dikerjakan karena biaya dan peralatan yang digunakan cukup mahal. Pemeriksaan indeks sel darah merah merupakan pemeriksaan hematologi rutin dengan efektivitas dan efisiensi yang cukup baik (Rathod, et al. 2007).

Selain indeks sel darah merah, saat ini telah dikembangkan beberapa formula (nilai indeks) penghitungan untuk uji saring talasemia dan untuk membedakan jenis anemia karena talasemia atau anemia defisiensi besi. Indeks tersebut melibatkan penghitungan Hb, hitung sel darah merah, hemoglobin eritrosit rerata / *Mean Corpuscular Hemoglobin* (MCH) dan volume eritrosit rerata / *Mean Corpuscular Volume* (MCV). Indeks tersebut adalah indeks Mentzer, Srivastava, Shine & Lal, England & Fraser. Keempat indeks tersebut digunakan untuk mendeteksi talasemia  $\beta$  minor (Niazi, et al. 2010). Penelitian ini akan menggunakan keempat indeks untuk skrining talasemia. Tujuannya adalah untuk melihat seberapa baik

indeks tersebut dalam mendeteksi talasemia minor.

## METODE

Penelitian dilakukan pada bulan Oktober 2012 sampai dengan Maret 2013 di Unit Transfusi Darah Daerah (UTDD) PMI DKI Jakarta. Penelitian ini menggunakan desain potong lintang (*Cross Sectional*). Populasi pada penelitian ini adalah seluruh donor di UTDD PMI DKI Jakarta. Sampel penelitian sebanyak 138 donor dengan kriteria inklusi yaitu konsentrasi Hb minimal 12,5 g/dL. Perkiraan besar sampel untuk menghitung berapa besar frekuensi pembawa sifat talasemia  $\alpha$  dan  $\beta$  pada populasi donor darah menggunakan rumus studi prevalensi  $Z\alpha$ .

Pemeriksaan talasemia dilakukan pada subjek penelitian yang memenuhi kriteria dan pengambilan sampel dilakukan secara random. Pemeriksaan tersebut meliputi hematologi rutin dan analisis Hb. Pada pemeriksaan tersebut dapat diketahui subjek dengan talasemia  $\beta$ , HbE dan suspek talasemia  $\alpha$ . Analisis DNA dilakukan pada sampel suspek talasemia  $\alpha$ . Pemeriksaan analisis Hb dan analisis DNA dilakukan di laboratorium molekular EIJKMAN. Analisis Hb menggunakan metode *High Performance Liquid Chromatography (HPLC Beta thalassemia short program, Bio-Rad Variant System II)*. Prosedur analisis DNA meliputi ekstraksi DNA dengan metode *puregene*, PCR Multipleks, PCR RFLP, dan elektroforesis. Pemeriksaan hematologi rutin menggunakan alat Sysmex KX-21 dengan metode *Impedance Counting*. Hasil penghitungan keempat Indeks yaitu indeks Mentzer, Srivastava, Shine & Lal, England & Fraser (Tabel 1) dibandingkan dengan hasil diagnosis talasemia. Penilaian seberapa baik indeks dalam mendeteksi talasemia minor dilakukan melalui penghitungan sensitifitas dan spesifisitas.

**Tabel 1**  
**Formula Penghitungan Indeks Pembeda Thalasemia  $\beta$  Minor**

Indeks	Formula	Thalasemia $\beta$ minor
Mentzer	MCV / RBC count	< 13
Srivasta	MCH / RBC	< 13,8
Shine & Lal	MCV x MCV x MCH /100	< 1530
England & Fraser	MCV - (5xHb) - RBC	< 0

(Niazi, 2010)

### HASIL DAN PEMBAHASAN

Pada uji saring thalasemia berdasarkan parameter hematologi rutin dan analisis Hb, dari 138 subjek donor didapatkan thalasemia  $\beta$  minor tiga subjek (2,17%), Hb varian yaitu HbE tiga subjek (2,17%). Sampel suspek thalasemia  $\alpha$  adalah sampel yang mempunyai kriteria hasil MCV dan MCH cenderung rendah, yaitu konsentrasi MCV 76 - 87 femtoLiter (fL) dan MCH 25 - 29 pikogram (pg) serta konsentrasi HbA2 normal (2,4 - 3,2%). Pada hasil skrining didapatkan 39 sampel yang mempunyai kriteria tersebut,

sehingga perlu dilakukan analisis DNA untuk menegakkan diagnosis thalasemia  $\alpha$  yaitu deteksi delesi satu gen globin  $\beta$ . Hasil analisis DNA didapatkan sampel dengan thalasemia  $\alpha$  sebanyak 5 sampel. Pada penelitian ini tidak dilakukan analisis Fe dan ferritin, sehingga individu dengan suspek thalasemia  $\alpha$  belum bisa dibedakan dengan anemia defisiensi besi.

Hasil penghitungan Indeks Mentzer, Srivastava, Shine & Lal, England & Fraser didapatkan hasil pada Tabel 2 di bawah ini.

**Tabel 2**  
**Hasil Penghitungan Indeks Terhadap Sampel Positif Dan Suspek Thalasemia**

Indeks Variabel	Mentzer < 13	Srivastava < 13,8	Shine & Lal < 1530	England & Fraser < 0
Thalasemia $\beta$ (n=3)	3 (100%)	2 (67%)	3 (100%)	1 (33%)
HbE (n=3)	1 (33%)	0	3 (100%)	1 (33%)
Thalasemia $\alpha$ (n= 5)	0	0	2 (40%)	1 (20%)
Suspek thalasemia $\alpha$ (n=34)	0	0	4 (11,8%)	2 (5,9%)
Normal (n=93)	0	0	0	0

Berdasarkan literatur, keempat indeks tersebut digunakan untuk membedakan jenis thalasemia  $\alpha$  (Niazi, 2010). Hasil

penghitungan sensitivitas dan spesifisitas keempat indeks menunjukkan hasil yang bervariasi, seperti terlihat pada Tabel 3.

**Tabel 3**  
**Sensitivitas, Spesifisitas, Positive Predictive Value, Negative Predictive Value dan Efisiensi Pemeriksaan Pada Masing-Masing Indeks Penentu Thalasemia  $\beta$**

Indeks	Sensitivitas	Spesifisitas	Positive predictive value	Negative predictive value	Efisiensi pemeriksaan
Mentzer	100,0 %	99,3 %	75 %	100,0 %	99,3 %
Srivastava	66,7 %	100,0 %	100 %	99,3 %	99,3 %
Shine & Lal	100,0 %	93,3 %	25 %	100,0 %	93,5 %
England & Fraser	33,3 %	97,0 %	60 %	98,5 %	95,7 %

Thalasemia merupakan kelainan yang mempunyai karakteristik khusus pada gambaran sel eritrosit, sehingga setiap parameter pemeriksaan yang terkait dengan pengukuran sel eritrosit merupakan informasi yang cukup berharga dalam deteksi dini thalasemia, khususnya pada thalasemia minor yang secara klinis tidak menimbulkan gejala (Bain 2006). Skrining dengan parameter hematologi dan analisis Hb dapat mendeteksi thalasemia  $\beta$  dan HbE. Pada individu dengan thalasemia  $\beta$  minor yang tidak menunjukkan gejala klinis, dapat ditemukan Hb A2 pada kisaran 4-7% (Fucharoen, et al. 1998). Hal tersebut sesuai dengan hasil pada penelitian ini, tiga sampel yang terdeteksi pembawa sifat thalasemia  $\beta$  mempunyai konsentrasi HbA2 4,9-5,7%. Selain itu, pada sampel tersebut terjadi penurunan nilai MCV dan MCH. Nilai MCV 62,9-71,1 fL dan MCH 18,9-22,4 pg. Tiga sampel yang teridentifikasi sebagai HbE mempunyai MCV dan MCH yang cukup rendah seperti pada pembawa sifat thalasemia  $\beta$  yaitu MCV 71,6-73,9 fL dan MCH 23,2 - 24,1 pg. Pada pemeriksaan analisis Hb, didapat konsentrasi HbA2 (+HbE) yang tinggi melebihi konsentrasi pada pembawa sifat thalasemia  $\beta$ , yaitu 27,2 - 28,9%. Pembawa sifat thalasemia  $\alpha$  mempunyai nilai MCV dan MCH dalam kisaran normal sampai dengan sedikit rendah, sehingga penegakan diagnosis harus dilakukan dengan analisis DNA. Pada penelitian ini didapat lima sampel thalasemia  $\alpha$  dengan nilai MCV 74,3 - 88,7 fL, MCH 24,8 - 28,6 pg dan analisis Hb dengan

konsentrasi HbA2 2,4 - 3,2%.

Berbagai macam formula penghitungan telah diciptakan untuk mempermudah proses uji saring, terlebih pada daerah dengan prevalensi tinggi dan tidak mempunyai akses untuk melakukan pemeriksaan analisis Hb dan analisis DNA. Pendekatan hematologi yang dilakukan untuk deteksi dini thalasemia telah dibuktikan cukup bermanfaat pada populasi dengan prevalensi cukup tinggi seperti di kawasan Asia (Rathod, 2007). Pada penelitian ini, dilakukan penghitungan dengan menggunakan indeks formula eritrosit, yang meliputi indeks Mentzer, Srivastava, Shine & Lal, serta Fraser & England. Penghitungan tersebut melibatkan parameter hitung sel eritrosit, MCH, MCV dan Hb. Keempat indeks tersebut merupakan pembeda thalasemia  $\beta$  dengan anemia defisiensi besi. Pada penderita thalasemia  $\beta$  didapat nilai MCV dan MCH yang cukup rendah jika dibandingkan dengan jenis thalasemia lainnya sehingga kondisi anemia lebih mudah ditemukan pada subjek dengan thalasemia  $\beta$  minor. Anemia pada penderita dengan thalasemia  $\beta$  minor seringkali salah diagnosis dengan anemia defisiensi besi, karena gambaran sel darah merah sama dengan penderita anemia defisiensi besi yaitu mikrositik hipokrom dengan variasi bentuk dan ukuran (Bain, 2006; Judd, 2010). Sehingga diciptakan beberapa jenis indeks formula eritrosit untuk membedakan kondisi tersebut.

Hasil penghitungan pada penelitian ini menunjukkan keempat indeks dapat

mendeteksi thalasemia  $\beta$  minor. Indeks Mentzer dan Shine & Lal dapat mendeteksi keseluruhan individu dengan thalasemia  $\beta$  minor (100%). Namun demikian, keempat indeks yang khusus mendeteksi thalasemia  $\beta$ , ternyata dapat mendeteksi jenis thalasemia lainnya, seperti pada Indeks Mentzer dapat mendeteksi HbE (33%), indeks Shine & Lal mendeteksi keseluruhan sampel HbE, thalasemia  $\alpha$  (40%) dan suspek thalasemia  $\alpha$  (11,8%). Indeks England & Fraser dapat mendeteksi thalasemia  $\beta$  (33%), HbE (33%), thalasemia  $\alpha$  (20%) dan suspek thalasemia  $\alpha$  (5,9%). Hal ini menunjukkan ketiga indeks tidak terlalu spesifik dalam mendeteksi thalasemia  $\beta$ . Selain itu, ketiga indeks tersebut hanya mendeteksi sebagian sampel thalasemia  $\beta$ , hal ini dimungkinkan karena ada sebagian sampel thalasemia  $\alpha$  dengan MCV yang cukup rendah. Disamping itu indeks Shine & Lal selain dapat mendeteksi keseluruhan sampel thalasemia  $\beta$  dapat juga mendeteksi sampel dengan HbE. Hal itu dimungkinkan karena penghitungan dan nilai rentang yang cukup besar sehingga sampel dengan sedikit penurunan MCV dapat dianggap hasil positif thalasemia  $\beta$ . Indeks Srivastava cukup spesifik dalam mendeteksi thalasemia  $\beta$  yang ditunjukkan dengan tidak satupun jenis thalasemia non  $\beta$  yang masuk dalam nilai, walaupun indeks Srivastava hanya mendeteksi 67% thalasemia  $\beta$ . Hasil penelitian lain yang dilakukan Niazi, dkk (2010), didapatkan persentase hasil formula tertinggi dalam mendeteksi thalasemia  $\beta$  adalah Indeks Mentzer (86,85%), diikuti oleh Srivastava (82,37%), England & Fraser (78,28%) dan Shine & Lal (72,43%).

Melengkapi hasil penelitian, dilakukan penghitungan sensitivitas, spesifisitas, positive dan negative predictive value serta efisiensi pemeriksaan. Derajat sensitivitas menunjukkan indeks Mentzer, Shine & Lal mempunyai

sensitivitas tertinggi, sedangkan spesifisitas tertinggi didapat oleh indeks Srivastava. Berdasarkan penelitian yang dilakukan Niazi, dkk (2010) didapat indeks Mentzer mempunyai sensitivitas 89% dan spesifisitas 81%. Hasil yang tidak jauh berbeda juga ditunjukkan pada studi yang dilakukan Ghaufouri (2006), yang mendapatkan hasil sensitivitas 90,9% dan spesifisitas 80,3% (Niazi 2010).

Pada penelitian ini tidak satupun indeks dengan hasil 100% sensitif dan spesifik, melainkan hanya salah satunya. Hasil sensitifitas/spesifisitas pada penelitian ini dapat mencapai 100%. Hal ini bisa dikarenakan, subjek penelitian merupakan individu sehat dengan Hb 12,5 g/dL tanpa adanya ibu hamil. Seperti diketahui, uji saring thalasemia pada ibu hamil dapat lebih sulit, karena pada ibu hamil terdapat peningkatan volume plasma (40-45%) yang merupakan efek fisiologis dari kehamilan, dan pada trimester ketiga akan mengalami penurunan konsentrasi Hb menjadi 10,5-14,5 g/dL. Disamping itu, anemia defisiensi besi juga sering terjadi selama kehamilan, terlebih jika kedua kondisi ini terjadi pada satu individu, maka deteksi thalasemia minor menjadi lebih sulit (Bain, 2006; Higgs, Olivieri, & Weatherall, 2009). Penilaian efisiensi pemeriksaan, didapatkan keempat indeks tersebut mempunyai persentase hasil yang hampir sama, yaitu berkisar 93,5 - 95,7%. Indeks tersebut dapat merupakan indeks pembeda yang cukup membantu terlebih jika pemeriksaan analisis Hb dan DNA belum dapat dilaksanakan.

## SIMPULAN

Parameter hematologi rutin dengan alat *hematology analyzer* merupakan metode pemeriksaan yang cukup baik pada proses uji saring thalasemia minor. Hal ini dibuktikan dengan perhitungan keempat indeks yang

dapat mendeteksi thalasemia  $\beta$ . Disamping itu, thalasemia  $\alpha$  dan Hb varian (HbE) juga dapat terdeteksi dengan perhitungan indeks, walaupun tidak 100%. Dari keempat indeks, yang dapat mendeteksi thalasemia  $\beta$  dengan sensitivitas baik yaitu indeks Mentzer, Shine & Lal. Indeks yang mempunyai spesifisitas baik yaitu indeks Srivastava.

Indeks formula eritrosit yang ada saat ini memang belum mencapai derajat sensitifitas dan spesifisitas 100%, akan tetapi indeks ini merupakan formula dengan hasil yang cukup baik dan efisien. Jika dibandingkan dengan pemeriksaan molekuler, maka parameter hematologi mempunyai kelebihan yaitu cukup efektif, efisien, alat tersedia dan dapat dilakukan secara rutin, serta biaya yang dikeluarkan lebih rendah jika dibandingkan dengan pendekatan molekuler, seperti metode HPLC (Rathod, et al. 2007).

Deteksi thalasemia melalui pendekatan molekuler, yaitu analisis Hb dan DNA tetap merupakan pemeriksaan konfirmasi untuk menentukan jenis thalasemia dan pola pewarisannya (Bain, 2006). Kedua pendekatan pemeriksaan tidak dapat dipisahkan satu sama lain. Indeks formula eritrosit yang ada dapat digunakan sebagai referensi untuk melakukan pemeriksaan yang lebih spesifik yaitu analisis Hb dan analisis DNA.

#### DAFTAR RUJUKAN

- Ahmed, N., Dawson, M., Smith, C., & Wood. 2007. *Biology of disease*, T & F informa, UK.
- Au W.Y, & Liang, R. 2007. *'Thalassemia management in Hong Kong'*, ISBT science series, vol.2, p:160-166.
- Bain, B.J. 2006. *Blood cells a practical guide*. 4th ed., Australia: Blackwell publishing.
- Higgs, D.R., Olivieri, N.F., & Weatherall, D.J. 2009, *Disorders of hemoglobin, Genetics, Pathophysiology, and clinical management* 2nd ed, eds. Steinberg MH, Forget BG, Higgs DR, & Weatherall DJ, Cambridge University Press, UK.
- Judd, S. J. 2010. *Health reference series, genetic disorders sourcebook*. 4th ed. USA: Omniographics.
- Fucharoen S., et.al. 1998. *Prenatal and postnatal diagnoses of thalasemias and hemoglobinopathies by HPLC*. Clinical chemistry, Vol.44, No.4 :740-747.
- Kohne, E. 2011. *Hemoglobinopaties clinical manifestation, diagnosis, and treatment*. Dtsch Arztebl Int, Vol.108, No.31-32 : 532-540.
- Muncie, H. L., & Campbell, J. S. 2009. *alpha and beta thalassemia*. American family physician, vol.80, no.4, p: 339-344.
- Niazi, M., Tahir, M., Raziq, F.E. & Hameed, A. 2010. *Usefulness of red cell indices in differentiating microcytic hypochromic anemias*. Gomal Journal of Medical Sciences, vol.8, no.2, p:125-129.
- Rathod, D.A., et.al. 2007. *Usefulness of cell counter-based and formulas in detection of  $\beta$ -thalasemia trait in areas of high prevalence*. American society for clinical pathology, vol.128, p:585-589.
- Rogers, K. 2011. *The human body, blood physiology and circulation*, New York USA : Britannica educational publishing.
- Sacher, R.A., & McPherson, R.A. 2004. *Tinjauan klinis hasil pemeriksaan laboratorium*.Ed. Hartanto, H. Jakarta: EGC.