

Deteksi Pembawa Sifat Thalassaemia di Banyumas Menggunakan *Capillary Electrophoresis*

Lantip Rujito,* Lina Sunayya,* Muhammad Basalamah,**
Joko Setyono,*** Wahyu Siswandari****

*Departemen Biologi Molekuler, Fakultas Kedokteran Universitas Jenderal Soedirman, Purwokerto

**Bagian Ilmu Kesehatan Anak, Rumah Sakit Umum, Banyumas

***Departemen Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Jenderal Soedirman, Purwokerto

****Departemen Patologi Klinik Fakultas Kedokteran Universitas Jenderal Soedirman, Purwokerto

Abstrak

Pendahuluan: Thalassaemia menjadi penyakit hematologi monogenik hereditas yang paling banyak pada populasi dunia. Deteksi pembawa sifat merupakan salah satu langkah yang sangat penting untuk program pencegahan thalassaemia. Banyumas sebagai salah satu kantong penderita thalassaemia belum didukung oleh data pembawa sifat yang akurat dari pemeriksaan populasi umum.

Tujuan: Mengetahui frekuensi pembawa sifat thalassaemia pada populasi umum Banyumas.

Metode: Penelitian bersifat cross sectional dengan menggunakan populasi umum yang tersebar di kabupaten Banyumas. Subyek penelitian adalah 183 orang dengan kriteria usia 17-60 tahun, tidak ada riwayat keluarga thalassaemia dan riwayat penyakit hematologi. Deteksi awal menggunakan kriteria HTA 2010 dengan menilai index eritrosit, dilanjutkan dengan pemeriksaan fraksi hemoglobin dengan metode *capillary electrophoresis*.

Hasil: Pada penyaringan pertama menggunakan index eritrosit ditemukan data bahwa suspek pembawa sifat thalassaemia adalah 8,2%. Dengan metode *capillary electrophoresis* selanjutnya, diketahui bahwa suspek pembawa thalassaemia β dan HbE sebesar 6,1 %, suspek pembawa thalassaemia β atau defisiensi besi 4,2% serta 1,2% varian hemoglobin lainnya.

Kesimpulan: Pembawa sifat thalassaemia di Banyumas cukup tinggi dengan kemungkinan pembawa sifat thalassaemia α dan β adalah 10%.

Kata kunci: Pembawa sifat thalassaemia, *capillary electrophoresis*

Detection of Thalassaemia Carrier Using Capillary Electrophoresis in Banyumas District

Lantip Rujito,* Lina Sunayya,* Muhammad Basalamah,**
Joko Setyono,*** Wahyu Siswandari****

*Department of Molecular Biology, Medical Faculty of Universitas Jenderal Soedirman, Purwokerto

**Department of Pediatrics, Health Medicine Hospital Banyumas

***Department of Biochemistry, Medical Faculty of Universitas Jenderal Soedirman, Purwokerto

****Department of Clinical Pathology, Medical Faculty of Universitas Jenderal Soedirman, Purwokerto

Abstract

Introductions: Thalassaemia is a most prevent of monogenic hematological diseases in the world's population. Carrier detection is a very important step for thalassaemia prevention program. Recently, Banyumas has many thalassaemia patients, however not supported by the accurate data about thalassaemia carrier in the general population.

Purpose: Identifying the frequency of thalassaemia carrier in the general population of Banyumas.

Method: Cross sectional study using the general population scattered in Banyumas district. Subjects were 183 people with 17-60 years of age criteria, there was no family history of thalassaemia and history of hematological diseases. Early detection using HTA criteria in 2010 to assess erythrocyte index, followed by examination of hemoglobin fractions by capillary electrophoresis method.

Results: At first screening using eristrosit index evaluation, study showed that the suspect thalassaemia career was 8.2%. Using capillary electrophoresis method further, it was known that β thalassaemia and HbE carrier suspect was identified about 6.1%; α thalassaemia or iron deficiency 4,2%; and other variant counted as 1.2%

Conclusion: Thalassaemia carrier in Banyumas was quite high with a possible carrier of α and β thalassaemia trait was 10%

Keywords: thalassaemia carrier, capillary electrophoresis

Pendahuluan

Data prevalensi thalassaemia di dunia diperkirakan 7% dari seluruh populasi global. Keadaan homozigot dengan penyakit yang berat terjadi pada 300 000-500 000 anak lahir tiap tahunnya.¹ Pada populasi Asia Tenggara dilaporkan bahwa frekuensi pembawa sifat hemoglobinopati dan thalassaemia adalah 45,5% dengan 1,34 anak dari 1000 kelahiran terlahir dengan kondisi klinis.² Di Indonesia, frekuensi pembawa sifat thalassaemia beta tercatat sebesar 3-10%.³

Diagnosis pembawa sifat thalassaemia beta di Indonesia biasanya didasarkan pada nilai index hematologis dengan parameter utama MCV < 80 fl, dan MCH < 27 pg. Penyaring lanjutan untuk deteksi ini adalah dengan menggunakan hemoglobin elektroforesis dengan teknologi kromatografi mikrokolom, isoelektrofocusing, ataupun HPLC.⁴ Teknologi HPLC dapat mendeteksi varian hemoglobin yang umum dan akurat mengukur HbA2 dan HbF, sehingga berguna untuk deteksi hemoglobinopati dan thalassaemia.^{5,6} Namun HPLC tidak mampu membedakan dengan detail fraksi HbE dan HbA2. HPLC juga kurang sensitif dalam mendeteksi HbS,

Hb Lepore dan HbA2 karena waktu retensi ada dalam rentang yang sama.⁷ Capillary Electrophoresis (CE) secara teknik adalah teknologi baru otomatis yang mampu mendeteksi Hb varian dengan lebih detail berdasarkan capillary zone electrophoresis (CZE). Beberapa laporan menyebutkan bahwa CE menunjukkan tingkat presisi dan akurasi yang tinggi dalam kuantifikasi Hb varian.⁸⁻¹⁰ HbE dan HbA2 yang memiliki retensi time yang sama pada HPLC dapat diseparasi dengan baik oleh metodologi CE.¹⁰

Banyumas merupakan salah satu daerah yang memiliki jumlah penderita thalassaemia yang cukup tinggi. Tercatat dalam data base Yayasan Thalassaemia Indonesia (YTI) Banyumas kurang lebih 200 penderita.¹¹ WHO menyebutkan bahwa daerah atau negara yang memiliki prevalensi di atas 5% disarankan untuk memiliki program pencegahan dan pengelolaan yang baik. Laporan penelitian thalassaemia terdahulu belum menyebutkan berapa sebenarnya prevalensi pembawa sifat thalassaemia di Banyumas. Sebagai bagian dari program pencegahan thalassaemia yang sedang dikembangkan, maka perlu penelitian tentang prevalensi ini dengan teknologi baru yang lebih akurat.

Metode

Desain penelitian *cross sectional* dengan menggunakan populasi umum dari para pendonor darah rutin atau baru. Dengan menggunakan rumus *proporsional study* direkrut sebanyak 183 subyek penelitian pada periode Agustus-Oktober 2012. Kriteria inklusi adalah laki-laki dan perempuan usia 17-60 tahun. Kriteria eksklusi adalah terdapat riwayat kelainan darah dan riwayat keluarga dengan diagnosis thalassaemia. Sebanyak 5 ml darah subyek ditampung dalam tabung EDTA untuk pemeriksaan index sel darah merah (anlyzer hematology automatic XT 2000i) dan fraksi hemoglobin *capillary electrophoresis* (SEBIA), sesuai dengan petunjuk dari manufaktur. Darah untuk pemeriksaan index darah dihomogenisasi terlebih dahulu selanjutnya dimasukkan dalam tabung adaptor pada mesin XT2000i untuk kemudian dilakukan pembacaan secara otomatis. Pemeriksaan hemoglobin capillary electrophoresis dimulai dengan sentrifugasi dan pengambilan pellet sel darah merah. Kemudian dilakukan pencampuran 50ul pellet sel darah merah dengan 400ul solusi kit *Capillary Hemoglobin* pada tabung mikro. Vortex selama 5 detik dan tempatkan 100 ul solusi preparasi pada adaptor mesin dan dilakukan *running* sampai pembacaan sesuai petunjuk dari manufaktur.

Kriteria pembawa sifat thalassaemia menggunakan kriteria HTA tahun 2010, dengan MCV<80 pg, MCH< 70 fl dan fraksi HbA2 > 3,5%. Analisa data dilakukan dengan menggunakan uji t untuk menilai perbedaan index darah antara probandus normal dan suspek thalassaemia, serta kurva ROC digunakan untuk menilai sensitifitas dan spesifisitas nilai-nilai tersebut. Sebelum pengambilan material penelitian semua subyek dilakukan *informed consent*.

Hasil Penelitian

Subyek penelitian diambil secara tersebar mewakili semuabagian dari kabupaten Banyumas dan dilakukan pada waktu kunjungan PMI ke daerah-daerah untuk pelayanan donor darah. Sampel penelitian tersebut berasal dari 13 kecamatan dari 28 kecamatan di Banyumas.

Karakteristik responden penelitian didominasi oleh pria yang jumlahnya mencapai 147 orang (82%). Subjek penelitian memiliki rentang usia 17 sampai dengan 64 tahun, dengan rerata usia adalah 37,8 tahun. Seluruh pendonor darah berkewarganegaraan Indonesia dan berdomisili di Kabupaten Banyumas dan sekitarnya. Sebanyak 179 pendonor berasal dari suku Jawa, dua orang pendonor berasal suku Sunda, serta dua pendonor lainnya masing-masing merupakan suku Cina dan Madura.

Capillary electrophoresis pada mesin Sebia™, merupakan metode pemisahan fraksi protein otomatis dengan melihat *peak value* sesuai dengan referensi. Gambar 1 merupakan output dari otomatisasi tersebut.

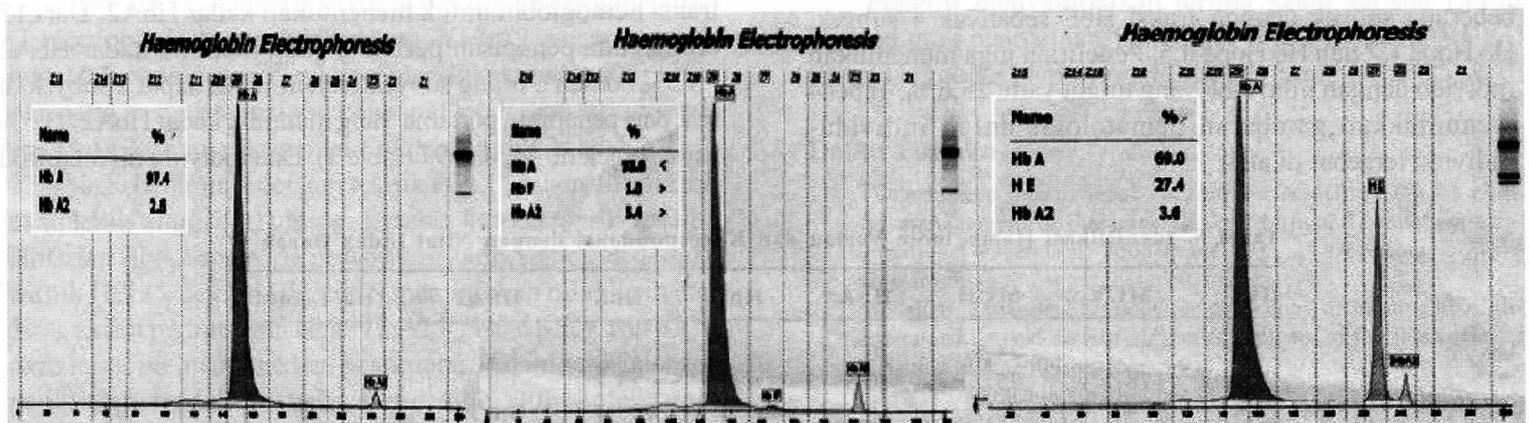
Tabel 1. Parameter Hematologi dan Fraksi Hemoglobin Subyek Penelitian

Parameter	Rerata	Minimum-Maximum
Hemoglobin (Hb) - g/dl	13,93	7,30-20,10
MCV - pg	86,32	66,40-98.60
MCH - fl	29,18	20,10-34,10
HbA - %	96,39	69,00-97,90
HbA2 - %	2,82	2,10-6,20
HbF - %	0,20	0,00-26,00

Parameter nilai hematologis dari subyek penelitian terjadi pada table 1. Sesuai dengan *Health Technology Assesment* 2010 disebutkan bahwa skrining pembawa sifat thalassaemia secara umum adalah jika didapatkan nilai hematologis MCV <80 dan MCH <27.⁴ Subyek dengan kriteria tersebut digambarkan dalam dalam tabel 2.

Tabel 2 menunjukkan bahwa dengan menggunakan MCV dan MCH terdapat 15 dari 183 subyek atau 8,2% adalah suspek pembawa sifat thalassaemia. Selanjutnya, pada pemeriksaan hemoglobin elektroforesis dengan kriteria HbA2 >3,5%⁴, didapatkan data dalam tabel 3.

Dengan uji parametric *independent t test* dapat diketahui bahwa terdapat perbedaan rerata MCV dan MCH antar individu-individu normal dengan individu suspek pembawa sifat.



Gambar 1. Peak Value dan Gambaran Pita Hemoglobin pada Capillary Electrophoresis
 Pada individu normal HbA2 ada pada rentang 2,2-3,2% sedangkan pada pembawa sifat thalassaemia HbA2> 3,5%.
 Pada kasus HbE capillary electrophoresis mampu membedakan dengan detail fraksi HbE dan HbA2

Tabel 2. Nilai MCV Dan MCH pada Penapisan Pertama

Kode Subyek	Hb	MCV	MCH
3	13,2	66,4	20,8
17	11,8	75,0	23,0
56	7,3	67,9	20,4
68	11,2	76,3	24,3
72	13,3	66,4	20,1
74	12,5	77,5	24,5
75	11,9	68,2	20,4
78	16,3	78,2	25,2
90	12,8	74,7	25,3
105	13,6	77,4	25,8
139	14,9	77,1	25,6
146	13,6	77,7	24,9
158	14,8	78,0	26,4
161	13,5	74,0	23,6
178	12,7	79,2	25,5

Tabel 3. Korespondensi Fraksi Hemoglobin Menggunakan Capillary Electrophoresis Dengan Nilai Hematologis pada Subyek yang Memiliki HbA2>3,5%

Kode Subyek	Hb	MCV	MCH	HbA2
3	13,2	66,4	20,8	6,2
46	13,4	68,0	27,7	3,9
72	13,3	66,4	20,1	5,6
75	11,9	68,2	20,4	5,4
78	16,3	78,2	25,2	3,8
90	12,8	74,7	25,3	3,6
97	13,5	84,7	26,8	3,6

Tabel 4. Uji Perbedaan Index Sel Darah Merah Antara Individu Normal dan Suspek Thalassaemia

Parameter	Kelompok	rerata	p value
rerata Hb	Normal	14,04 (±1,5)	0,77
	Suspek	13,10 (±1,8)	
rerata MCV	Normal	87,61 (±3,6)	0,00
	Suspek	76,41 (±5,3)	
rerata MCH	Normal	29,78 (±1,5)	0,00
	Suspek	24,43 (±2,2)	

Selain fraksi hemoglobin utama tersebut juga ditemukan beberapa subyek dengan fraksi HbE sebanyak 4 subyek, Hb Hope 1,2 dan Hb Hope 0,5. Penelitian juga menemukan individu dengan nilai HbF yang tinggi yaitu 25,6%. Tabel 4 menunjukkan gambaran hematologis untuk individu-individu tersebut di atas.

Tabel 5. Identifikasi Hemoglobin Varian dan Korespondensi dengan Nilai Index Darah

Hb	MCV	MCH	HbA	HbF	HbE	HbA2	Hb Lain
12,5	77,5	24,5	70,7	-	25,8	3,5	
16,3	78,2	25,2	70,5	-	25,7	3,8	
12,8	74,7	25,3	69	-	27,4	3,6	
14,9	77,1	25,6	70,5	-	26,1	3,4	
13,6	77,4	25,8	72,3	25,6	-	2,1	
13,7	84,5	30,9	96,4	-	-	3,1	Hb Hope

Diskusi

Banyumas sebagai salah satu kantong penderita Thalassaemia di Jawa Tengah mengalami peningkatan penderita yang cukup signifikan. Tercatat dalam data base dari tahun 2009 sampai 2011 angka penderita naik mencapai 200% lebih.¹¹ Data ini menunjukkan bahwa permasalahan thalassaemia di Banyumas merupakan permasalahan yang serius. Sebagai rangkaian untuk mengatasi problem ini salah satunya adalah melakukan penelitian untuk mengetahui angka pembawa sifat di Banyumas.

Penapisan dini menggunakan nilai MCV dan MCH masih menjadi rujukan para ahli di dunia karena teknik yang cepat, cukup akurat, dan dapat dikerjakan di setiap pusat kesehatan. Dari hasil penapisan pertama dari 183 subyek penelitian dapat diketahui bahwa 15 atau 8,2% subyek adalah suspek pembawa sifat thalassaemia. Subyek tersebut memiliki rentang nilai MCV 66,4-79,2 fl dan MCH 20,1-26,4 pg, dengan kadar Hb yang relatif normal. WHO menyebutkan bahwa nilai MCH <27 pg dapat dijadikan nilai bahwa seorang individu kemungkinan adalah pembawa sifat thalassaemia β, pembawa sifat thalassaemia α, atau defisiensi besi.^{1,12}

Secara umum, subyek penelitian dengan nilai MCV dan MCH yang rendah menunjukkan kadar hemoglobin relatif normal atau sedikit menurun. Pada sampel nomer 3, 72, 78, 105, 139, 146, 158, 161 memiliki nilai hemoglobin yang relatif normal. MCV yang rendah menunjukkan bahwa sel eritrosit mengalami perubahan ukuran menjadi lebih kecil dari pada biasanya. Nilai kadar Hb yang relatif normal terjadi karena mekanisme kompensasi dengan memperbanyak sel darah merah yang beredar.¹³ Kompensasi ini diharapkan dapat memperbaiki kondisi lingkungan internal sehingga mengurangi terjadinya anemia.¹⁴

Dari penapisan MCV dan MCH, untuk membedakan pembawa sifat thalassaemia β, pembawa sifat thalassaemia α, atau defisiensi besi diperlukan pemeriksaan hemoglobin elektroforesis dengan *cut off point* HbA2 : 3,5%.¹⁵ Jika HbA2 >3,5% maka individu tersebut adalah pembawa sifat thalassaemia β, jika <3,5% adalah thalassaemia α atau defisiensi besi.¹⁵ Skrining selanjutnya digunakan analisis fraksi hemoglobin untuk menentukan kadar HbA2. Dari 15 orang pada penapisan pertama, yang memiliki kadar HbA2 >3,5% adalah 5 orang subyek. Selain itu terdapat 2 subyek di luar dari penapisan pertama yang memiliki kadar HbA2 >3,5% yaitu subyek no 46, dan 97 (table 3). Dua individu ini memiliki

kadar MCV dan MCH dalam rentang normal. Keadaan ini dapat terjadi kemungkinan dari adanya *coinheritance* pembawa thalassaemia α ($\alpha\alpha$ —), (α -/ α -), atau *point mutation* pada gen α yang menyebabkan gangguan ekspresi gen α . Pada keadaan tersebut, rasio α/β menjadi lebih baik sehingga memperbaiki karakteristik nilai MCV dan MCH.¹⁶ Selain itu beberapa mutasi *silent* pada daerah promoter atau poliadenilat juga memperlihatkan nilai index eritrosit yang normal.¹⁷

Uji t mengindikasikan bahwa terdapat perbedaan rerata yang bermakna pada nilai MCV dan MCH antara individu normal dan suspek thalassaemia. Nilai Hb tidak berbeda secara bermakna, namun rerata umum menunjukkan bahwa Hb pada supek cenderung lebih rendah. Rendahnya nilai MCV dan MCH kelompok pembawa sifat thalassaemia dapat dijelaskan melalui teori defek sintesis gen globin- β . Defek sintesis gen globin- β menghasilkan produksi eritrosit yang berukuran lebih kecil dari normal. Gangguan sintesis gen globin juga menyebabkan jumlah komponen hemoglobin di eritrosit menurun, akibatnya warna eritrosit menjadi pucat (hipokromik).¹⁴

Analisis kurva ROC menunjukkan bahwa MCV dan MCH dapat digunakan sebagai perangkat penapis thalassaemia. Dengan menggunakan nilai HbA2 $>3,5\%$ sebagai batasan, nilai MCV <80 fl dan MCH <27 pg pada penelitian ini memiliki nilai sensitifitas 71,4% dan 85,7%, spesifisitas 94% dan 92%, serta area dibawah kurva 0,88 dan 0,95 dengan signifikansi 0,01 dan 0,001. Sebagian besar negara menggunakan MCH <27 pg sebagai patokan namun MCV yang dirujuk bervariasi tiap negara seperti China dan Hongkong memakai patokan nilai <80 fl,¹⁸ Sardinia <78 fl,¹⁹ bahkan beberapa negara mediterania menggunakan nilai <70 fl.²⁰ Pemakaian nilai ini tentu telah dilandaskan atas keadaan setempat. Pada suatu penelitian, penurunan nilai MCV <75 fl menyebabkan kehilangan angka pembawa sifat sebesar 3%.²¹ Patokan MCV di atas 80 fl menyebabkan over diagnosa yang berdampak pada efisiensi biaya, walaupun beberapa *silent mutation* bisa lolos dari skrining.

Studi juga menunjukkan bahwa dengan menggunakan *capillary electrophoresis* terdapat 4 individu dengan varian Hemoglobin E, terpisah jelas dengan HbA2. Secara umum, nilai HbE pada kasus heterozigot memiliki kuantitas 24-30%²² dan pada kasus homozigot mencapai lebih dari 80%.²² Pada studi ini diketahui varian nilai HbE pada individu adalah 25,7-27,4%. Sebelumnya dengan teknik HPLC, kuantifikasi HbE akan lebih tinggi dari ukuran tersebut karena *time retention* HbE dan HbA2 ada pada posisi yang sama sehingga dengan teknik HPLC, deteksi HbE akan menunjukan nilai lebih dari 30%, akibat perhitungan HbE+HbA2.^{9,10} Nilai MCV dan MCH pada kasus ini menunjukkan penurunan. Hal ini sesuai dengan penelitian terdahulu bahwa individu HbE heterozigot menunjukkan nilai MCV dalam rentang 69-79,5 fl dan MCH 23-26,2 pg.²³

Penelitian juga mengungkap adanya HbF yang tinggi

(HbF=26%, Hb normal, dan penurunan MCV, MCH) pada salah satu individu. Keadaan ini disebut sebagai HPFH (*Hereditary Persistence Fetal Hemoglobin*). Hemoglobin F yang tinggi ini kemungkinan disebabkan oleh HPFH tipe delesi. Delesi yang melibatkan gena δ dan gena α menyebabkan aktivasi gena γ akibat *enhancer* pada posisi 3' berhubungan dengan gena γ .²⁴ Selain tipe delesi perlu dicurigai juga adanya mutasi titik pada gena globin γ yang menyebabkan peningkatan ekspresi rantai globin γ .²⁵

Individu dengan MCV dan MCH menurun tetapi HbA2 $\leq 3,5\%$ berjumlah 8 orang. Sesuai dengan *guideline* dari WHO, subyek ini kemungkinan adalah pembawa thalassaemia α atau individu dengan defisiensi besi.¹⁵ Untuk memastikan hal ini perlu adanya pemeriksaan feritin atau transferin lanjutran yang dapat digunakan dalam penapisan berikutnya. Pada penelitian ini terdeteksi juga jenis varian hemoglobin lain termasuk Hb Hope 1,2 dan Hb Hope 0,5 pada 2 individu. Varian ini tidak menampakkan kelainan klinis baik dalam bentuk heterozigot maupun homozigot, sehingga tidak perlu perhatian lebih lanjut. Namun *coinheritance* dengan jenis thalassaemia α^0 dapat menimbulkan keadaan klinis ringan sampai moderat.²⁶

Kesimpulan

Secara keseluruhan didapatkan data bahwa suspek pembawa sifat thalassaemia dan hemoglobin varian di Banyumas adalah sebagai berikut; pembawa thalassaemia α dan HbE sebanyak 11 individu atau sekitar 6,1%; kemungkinan pembawa thalassaemia β atau defisiensi besi 8 orang atau 4,2%; serta 1,2% varian hemoglobin lainnya termasuk Hb Hope dan HPFH. Hal ini menunjukan nilai yang konsisten dengan penelitian awal, yang menyebutkan bahwa angka pembawa sifat di Indonesia berkisar pada angka 3-10%.³ Penelitian juga menunjukkan bahwa *capillary electrophoresis* dapat meningkatkan presisi keakuratan dalam deteksi varian hemoglobin. Penelitian lanjutan disarankan untuk menganalisa hasil DNA, sebagai gold standard pemeriksaan.

Ucapan Terima Kasih

Peneliti menyampaikan terima kasih kepada LPPM Unsoed atas pendanaan penelitian melalui skema RUKU (Riset Unggulan Kompetensi Unsoed) tahun 2012.

Daftar Pustaka

1. Thalassaemia International Federation. Guidelines for the clinical management of thalassaemia 2nd edition. Thalassaemia International Federation; 2008 [cited 2011 28 December]; Available from: [http://www.thalassaemia.org.cy].
2. Modell B, Darlison M. Global epidemiology of haemoglobin disorders and derived service indicators. Bulletin of the World Health Organization. 2008;86 (6).
3. Sofro AS. Molecular pathology of beta-thalassaemia in Indonesia. The Southeast Asian journal of tropical medicine and public health. 1995;26 Suppl 1:221-4.
4. Health Technology Assesment. Pencegahan Thalassaemia (Hasil Kajian HTA tahun 2009). Dirjen Bina Pelayanan Medik

- Kementerian Kesehatan Republik Indonesia, editor. Jakarta, 2010.
5. Ou CN, Rognerud CL. Diagnosis of hemoglobinopathies: electrophoresis vs. HPLC. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*. 2001;313(1-2):187-94.
 6. Fucharoen S, Winichagoon P, Wisedpanichkij R, Sae-Ngow B, Sriphanich R, Oncoung W, *et al*. Prenatal and postnatal diagnoses of thalassaemias and hemoglobinopathies by HPLC. *Clinical chemistry*. 1998;44(4):740-8.
 7. Brants A. Hemoglobinopathy and thalassaemia detection: Traditional methods and a novel method - capillary electrophoresis technology. *MLO: Medical Laboratory Observer*. 2011;43(10):22-5.
 8. Mantikou E, Harteveld CL, Giordano PC. Newborn screening for hemoglobinopathies using capillary electrophoresis technology: Testing the Capillary® Neonat Fast Hb device. *Clinical biochemistry*. 2010;43(16-17):1345-50.
 9. González-Peñas E, Leache C, López de Cerain A, Lizarraga E. Comparison between capillary electrophoresis and HPLC-FL for ochratoxin A quantification in wine. *Food Chemistry*. 2006;97(2):349-54.
 10. Greene DN, Pyle AL, Chang JS, Hoke C, Lorey T. Comparison of Sebia Capillary Flex capillary electrophoresis with the BioRad Variant II high pressure liquid chromatography in the evaluation of hemoglobinopathies. *Clinica Chimica Acta*. 2012;413(15-16):1232-8.
 11. Rujito L, Setyono J. Quality of life, Ferritin Levels, and Screening Patients with Thalassaemia in Banyumas. The First International Conference in Medicine and Health Sciences (ICMHS). Purwokerto: Medical Faculty and Health Sciences of Jenderal Soedirman University. 2011.
 12. Langlois S, Ford JC, Chitayat D. Carrier Screening for Thalassaemia and Hemoglobinopathies in Canada. *Joint SOGC-CCMG Clinical Practice Guideline*. 2008;218.
 13. Higgins C. Full blood count (RBC, Hb, PCV, MCV, MCH and reticulocytes). *Nursing times*. 1995;91(7):38-40.
 14. Fialon P, Leaute AG, Sassier P, Vallot C, Wone C. Use of red blood cell indices (MCV, MCH, RDW) in monitoring chronic hemodialysis patients treated with recombinant erythropoietin. *Pathologie-biologie*. 1993;41(10):931-5.
 15. Organization WH. *Guideline for the Control of Haemoglobin Disorder*. London: World Health Organization, 1994; p: 26-30.
 16. Galanello R, Origa R. Beta-thalassaemia. *Orphanet Journal of Rare Diseases*. 2010;5:11:1-15.
 17. Li LY, Li Q, Song LL, Jin WJ, Ma ZH, Yu YH, *et al*. The value of MCV, MCH and HbA(2) in laboratory screening of thalassaemia. *Zhonghua fu chan ke za zhi*. 2012;47(2):96-100.
 18. Shen C, Jiang YM, Shi H, Liu JH, Zhou WJ, Dai QK, *et al*. Evaluation of indices in differentiation between iron deficiency anemia and beta-thalassaemia trait for Chinese children. *Journal of pediatric hematology/oncology*. 2010;32(6):e218-22.
 19. Galanello R, Melis MA, Ruggeri R, Addis M, Scalas MT, Maccioni L, *et al*. Beta 0 thalassaemia trait in Sardinia. *Hemoglobin*. 1979;3(1):33-46.
 20. Weatherall DJ. Phenotype-genotype relationships in monogenic disease: lessons from the thalassaemias. *Nature reviews Genetics*. 2001;2(4):245-55.
 21. Ma ES, Chan AY, Ha SY, Lau YL, Chan LC. Thalassaemia screening based on red cell indices in the Chinese. *Haematologica*. 2001;86(12):1310-1.
 22. Sae-ung N, Srivorakun H, Fucharoen G, Yamsri S, Sanchaisuriya K, Fucharoen S. Phenotypic expression of hemoglobins A2, E and F in various hemoglobin E related disorders. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*. 2012;48(1):11-6.
 23. Safyudin. *Nilai Hematologis dan Analisis Hemoglobin : Suatu Prediksi Jenis Mutasi Thalassaemia-α Pada Populasi Melayu di Sumatera Selatan*. Jakarta: Universitas Indonesia; 2003.
 24. Forget BG. Molecular Basis of Hereditary Persistence of Fetal Hemoglobin. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1998;850(1):38-44.
 25. Xu XM, Li ZQ, Liu ZY, Zhong XL, Zhao YZ, Mo QH. Molecular characterization and PCR detection of a deletional HPFH: application to rapid prenatal diagnosis for compound heterozygotes of this defect with beta-thalassaemia in a Chinese family. *American journal of hematology*. 2000;65(3):183-8.
 26. Higgs DR, Engel JD, Stamatoyannopoulos G. Thalassaemia. *The Lancet*. 2012;379(9813):373-83.

