

Diagnostik Talasemia dan Kepentingannya

Sunarto

Bagian Ilmu Kesehatan Anak Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada
RSUP DR. Sardjito, Yogyakarta

Key words : α - and β -thalassemia – routine tests – globin synthesis and DNA analysis – thalassemia diagnosis – thalassemia control program.

PENDAHULUAN

Talasemia adalah anemi hemolitik hereditas yang disebabkan oleh kurang atau tidak adanya sintesis rantai globin yang merupakan penyusun hemoglobin (Hb). Karena ada 4 macam rantai globin, yaitu α , β , γ , dan σ yang merupakan penyusun Hb setelah lahir, maka dikenal talasemia α , β , γ , dan σ . Di samping itu ada bentuk campuran, seperti talasemia $\alpha\beta$. Dua bentuk talasemia yang mempunyai arti klinik – karena menimbulkan gejala – adalah talasemia- α dan talasemia- β . Karena sifat resesif dari gena globin dan pewarisannya menurut hukum Mendel autosomal, maka hanya bentuk homozigot yang menimbulkan masalah klinik.

Di samping talasemia, Hb E merupakan stigma di Asia Tenggara. Sebenarnya HbE homozigot hanya menunjukkan gejala Minis anemia ringan, tetapi bila Hb E berinteraksi dengan talasemia-3 sehingga terjadi heterozigot campuran (*compound heterozygote* = penyakit tal. β /Hb E), maka penderita akan menunjukkan gejala klinis seperti talasemia mayor, meskipun biasanya lebih ringan. Interaksi antar tipe talasemia atau antara talasemia dan hemoglobinopati lain dapat kompleks sehingga memerlukan uji laboratorium yang kompleks pula⁽¹⁾.

Dalam makalah ini akan dibicarakan uji diagnostik pada talasemia, manfaatnya untuk mengenal kasus dan dampaknya terhadap penanggulangan talasemia.

UJI LABORATORIUM PADA TALASEMIA

Berbagai uji laboratorium diperlukan untuk diagnostik sindrom talasemia, mulai dari uji darah sederhana, indeks hematologi, morfologi eritrosit dan jumlah retikulosit yang semuanya termasuk pemeriksaan rutin; selanjutnya fragilitas eritrosit yang sangat mudah untuk dilaksanakan, pemeriksaan Hb F, Hb A₂, Hb E dan elektroforesis yang memerlukan peralatan tidak terlalu canggih sampai analisis sintesis globin dan analisis DNA yang lebih canggih^(2,3), beberapa di antaranya seperti tertera di bawah.

Preparat apus darah tepi sindrom talasemia menunjukkan kelainan yang jelas, berupa anisositosis yang nyata, hipokromi, poikilositosis, bentuk sel tak keruan (*bizarre cell*), *fragmented cell*, normoblas (asidofil) kadang sampai banyak sekali sehingga mempertinggi jumlah leukosit, *basophilic stippling*; sel target (menyolok pada Hb E homozigot); retikulosit meningkat. Adanya *inclusion bodies* dalam eritrosit pada pengecatan dengan *brilliant cresyl blue* atau *methylene blue* merupakan kriteria diagnostik penyakit Hb H⁽¹⁾.

Mean corpuscular volume (MCV) dan *mean corpuscular hemoglobin* (MCH) bersama fragilitas osmotik merupakan uji saring yang sederhana dan cepat⁽³⁾. Bain⁽⁴⁾ melaporkan pada wanita hamil, MCV kurang dari 83 uu3 dapat dipakai sebagai uji saring awal *trait* talasemia- β dengan sensitivitas amat tinggi. Demikian pula MCH <26ug. Sayang sekali nilai-nilai itu hanya

dapat diandalkan bila diperoleh dengan *electronic counter*. Pemeriksaan yang setara dengan nilai MCV dan MCH adalah pemeriksaan mikroskopik preparat apus darah tepi dengan pengecatan Giemsa, Wright, May-Grunwald atau May-Grunwald-Giemsa. Adanya mikrositosis dan hipokromi harus mengingatkan kita kepada *trait* talasemia di samping anemi defisiensi besi^(2,3).

Uji fragilitas osmotik satu tabung dengan 0,36% larutan salin terbufer mudah sekali dikerjakan dan mempunyai arti yang sangat penting sebagai uji saring: pada orang normal lebih dari 96% eritrosit akan terhemolisis, sedangkan pada penderita talasemia atau *trait* banyak eritrosit tidak mengalami hemolisis osmotik⁽³⁾.

Inclusion bodies dalam eritrosit merupakan kelebihan globin- β dan dapat diperlihatkan dengan pengecatan *methylene blue* (tampak bulat, terdistribusi tak rata) atau dengan *brilliant cresyl blue* (tampak berukuran sama dan rata terdistribusi). Uji ini merupakan kriteria diagnostik penyakit Hb H⁽³⁾. *Inclusion bodies* juga terdapat pada talasemia- β pasca splenektomi⁽¹⁾.

Hb F diperiksa dengan memanfaatkan sifat resistennya terhadap asam dan alkali kuat. Secara mikroskopik, pada preparat apus darah tepi yang dipaparkan pada larutan asam semua Hb kecuali Hb F akan terelusi keluar, sehingga eritrosit yang mengandung banyak Hb F akan tampak oranye atau merah dengan pengecatan eosin atau tampak biru tua dengan pengecatan *amido black*; sel yang tidak mengandung Hb F tampak pucat sehingga dinamakan *ghost cell*. Normal kurang dari 8% eritrosit memperlihatkan pengecatan positif ringan; pada talasemia- β banyak sekali eritrosit tercat dengan intensitas tak sama antar sel, sedang pada *high persistent fetal hemoglobin* (HPFH) kenaikan Hb F merata pada semua eritrosit⁽²⁾. Pemeriksaan Hb F spektrofotometrik metode Pembrey (modifikasi dari metode dua-menit Betke) memberi hasil yang *reproducible* pada kadar Hb F 0,5–50%, sedangkan untuk kadar Hb F di atas 50% metode Jonxis dan Visser lebih baik⁽¹⁾. Hb F meninggi pada 50% *trait* talasemia-, tetapi ini tidak punya anti diagnostik. Hb F amat meningkat pada talasemia- β homozigot dan pada HPFH⁽³⁾.

Elektroforesis Hb memegang peranan sangat penting pada diagnostik sindrom talasemia⁽¹⁾. Elektroforesis dapat memisahkan berbagai jenis hemoglobin. Prinsip elektroforesis adalah memanfaatkan sifatamfoter dari globin sebagai molekul protein.

Rantai globin – dari Hb normal maupun abnormal – mempunyai muatan listrik dengan kekuatan yang berbeda-beda. Bila hemolisis eritrosit ditaruh dalam medan listrik, maka berbagai macam Hb akan bergerak ke arah salah satu kutub dengan kecepatan yang berbeda-beda tergantung dari muatan listriknya, sehingga dalam waktu tertentu akan terpisah satu sama lain. Dalam praktek biasanya dipakai lempeng selulose asetat sebagai *supporting medium*, meskipun mungkin *starch gel medium* lebih baik⁽¹⁾.

Dengan elektroforesis, Hb A₂, Hb E dan lain-lain Hb dapat ditentukan secara kuantitatif dengan cara mengelusi pita-pita hasil elektroforesis. Prosedur ini secara teknis rumit sedang penentuan dengan densitometer (*scanner*) kurang dapat diandalkan^(2,3).

Elektroforesis juga digunakan untuk memisah-misahkan fragmen *deozynucleic acid* (DNA) dengan ukuran panjang yang berbeda-beda pada analisis DNA.

Kromatografi mikrokolom merupakan cara yang mudah dan memuaskan untuk menentukan Hb A₂ dan Hb E. Nilai normal adalah 1,5%–3,5% dengan rerata 2,28%; pada *trait* talasemia- β berkisar 3,6%–7,8% dengan rerata 5,2%, sedangkan pada Hb E homozigot berkisar antara 25% sampai 30%^(2,3).

Uji presipitasi DCIP (*dichlorophenolindolphenol*) digunakan untuk uji saring Hb E. Molekul Hb E akan mengalami disosiasi dan presipitasi bila diinkubasikan dengan cat tersebut pada 37°C. Timbulnya banyak endapan pada dasar tabung menunjukkan Hb E homozigot, sedangkan kekeruhan atau endapan ringan terdapat pada Hb E heterozigot, penyakit Hb H dan penyakit tal- β /Hb E. Kekeruhan juga terdapat pada normal, defisiensi besi, *trait* talasemia dan hemoglobin *Constant Spring* (Hb CS)⁽³⁾.

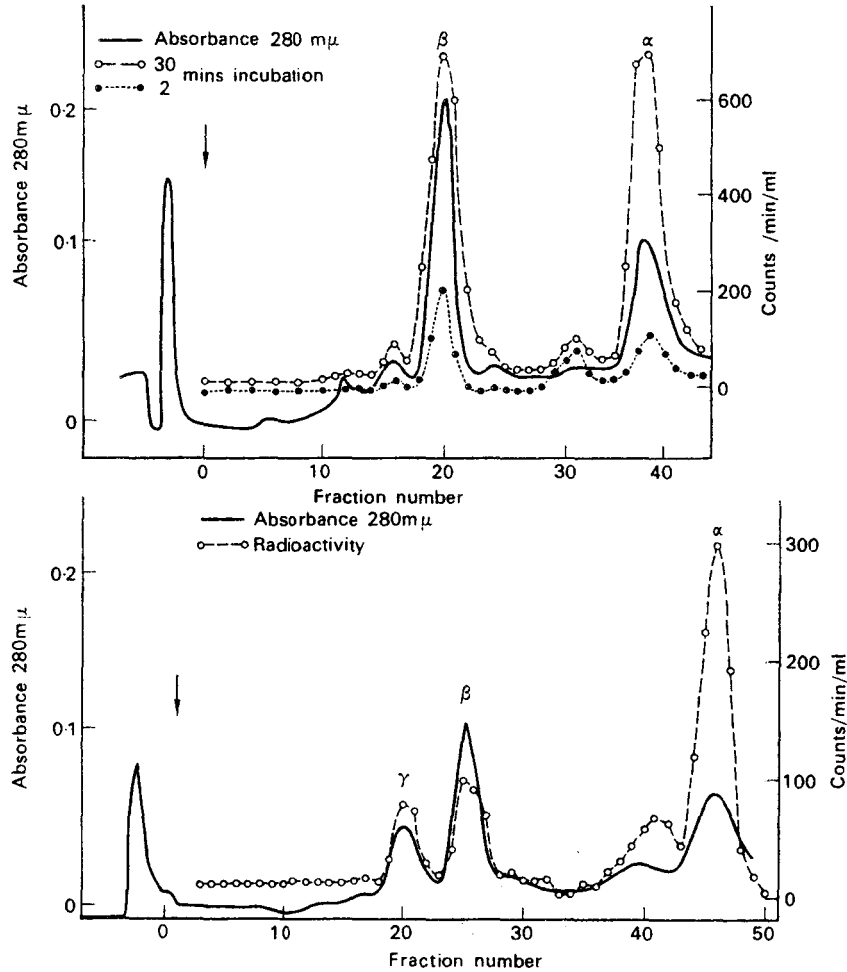
Analisis sintesis rantai globin adalah pemeriksaan laboratorium yang secara tegas membuktikan ketidakseimbangan produksi rantai globin pada talasemia. Rantai globin masih disintesis oleh retikulosit, sehingga sintesis rantai itu dapat diukur secara *in vitro* pada eritrositdarah tepi^(1,5,6,7,8). Pada prosedur ini eritrosit diinkubasikan dengan leucin radioaktif selama waktu tertentu, kemudian dicuci, dilisiskan dan rantai-rantai globin dipisahkan dengan kromatografi kolom. Jumlah radioaktivitas yang terikat pada masing-masing jenis rantai globin menunjukkan besarnya sintesis selama masa percobaan itu.

Gambar 1 memperlihatkan analisis sintesis rantai α , β dan γ pada normal dan pada talasemia⁽¹⁾.

Analisis DNA adalah teknik pemeriksaan yang relatif baru. Pada prosedur ini DNA yang dianalisis bisa dari sel apa saja, karena setiap sel dari suatu individu mengandung semua gen/DNA yang ada pada individu tersebut, tetapi gen tertentu hanya berfungsi pada organ tertentu; misalnya gen yang menyandi insulin hanya berfungsi pada sel- β Langerhans, gen globin dalam eritrosit saja yang berfungsi membentuk rantai globin. Karena itu analisis DNA untuk mendeteksi mutasi pada gen globin dapat dilakukan pada leukosit polimorfonuklear, fibroblas, sel epitel pipi dan sebagainya⁽⁹⁾, bahkan pada darah kering⁽¹⁰⁾.

Terhadap DNA dapat dilakukan pemeriksaan^(1,11,12) :

1. Deteksi direk delesi gen : dengan analisis *Southern blot* delesi gen- α pada talasemia- α^o heterozigot dapat digunakan *probe* gen-C, dan pada talasemia- α^+ dan talasemia- α^o homozigot dengan menggunakan *probe* gen- α .
2. Deteksi direk gen mutan dengan enzim endonuklease restriktif : endonuklease restriktif – suatu enzim berasal dari bakteri – memotong DNA pada tempat tertentu. Ragen yang dihasilkan mempunyai ukuran bermacam-macam dan dapat dipisah-pisahkan dengan elektroforesis. Apabila suatu mutasi menyebabkan hilangnya suatu sisi restriksi (*restriction site*) dalam gen, maka suatu fragmen restriksi dengan ukuran berbeda akan muncul dan ini dapat digunakan untuk mengidentifikasi adanya abnormalitas gen.
3. Deteksi mutasi dengan probe oligonukleotida sintetik : bila mutasi telah diketahui, maka suatu *probe* oligonukleotida – yaitu



Gambar 1. Sintesis rantai globin: pada orang normal sintesis globin- α dan - β seimbang; pada talasemia- β globin- β \ll globin- α ⁽¹⁾.

suatu untai DNA yang komplementer dengan DNA mutan – dapat disintesis. Oligonukleotida tersebut akan mengidentifikasi mutan secara langsung.

4) Deteksi mutasi dengan linkage analysis : cara ini dapat digunakan bila mutasi tidak dikenal. Seperti di atas, endonuklease restriksi menghasilkan fragmen dengan berbagai ukuran panjang. Beberapa tempat pemotongan adalah polimorfik dan sifat ini diwariskan menurut hukum Mendel; *restriction fragment length polymorphism (RFLP)*. Jika lokus mutan terkait terhadap polimorfisme, maka analisis DNA dari orang tua dan lain-lain anggota keluarga mengenai polimorfisme tersebut dapat mengidentifikasi apakah anak atau janin mewarisi mutasi tersebut.

Untuk dapat dianalisis jumlah DNA harus cukup. Dari cuplikan yang hanya sedikit, DNA dapat diperbanyak dengan *cloning*^(13,14) atau dengan *polymerase chain reaction (PCR)*. Kloning memerlukan waktu sampai 10 hari, sedangkan prosedur PCR hanya memerlukan waktu beberapa jam^(15,16,17,18). Prinsip cara ini adalah: oligonukleotida sintetik yang komplementer dengan suatu segmen DNA/gena dapat bertindak sebagai primgr yang dapat mengamplifikasi gena itu secara enzimatik *in vitro*, sehingga dari satu untai DNA dapat diperbanyak menjadi

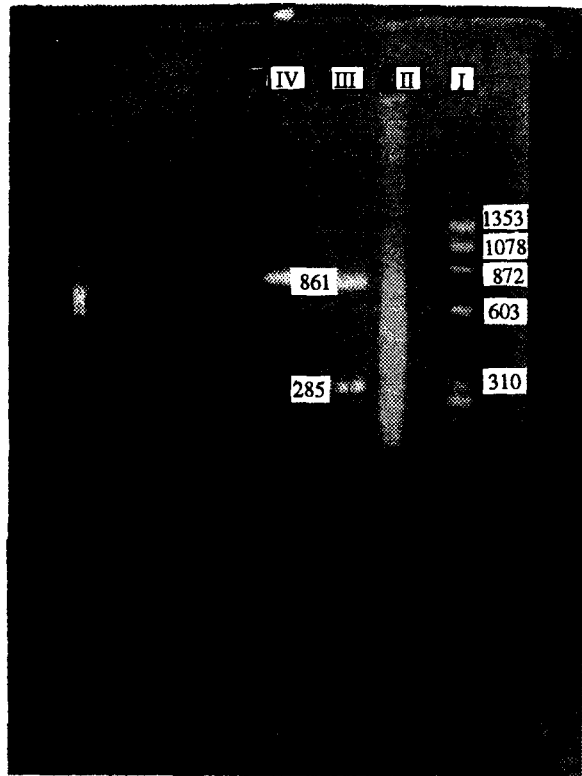
$> 10^6$ kali.

Suatu prosedur yang baru-baru ini dikembangkan adalah deteksi mutan secara langsung dengan cara *amplification refractory mutation system (ARMS)*. Prinsip cara ini adalah: hanya primer yang komplementer dengan urutan DNA mutan yang dapat mengamplifikasikan segmen DNA target^(19,20). Jika mutan yang diteliti memang komplementer dengan primer yang dipakai, maka akan terjadi amplifikasi, sebaliknya tidak terjadinya amplifikasi berarti mutan yang diteliti tidak komplementer dengan primer yang dipakai, sehingga percobaan harus dilanjutkan lagi dengan primer yang lain. DNA produk amplifikasi dielektroforesis dan selanjutnya dibaca dengan *probe* radioaktif atau divisualisasikan dengan pengecatan etidium bromida. **Gambar 2** memperlihatkan basil analisis DNA pada talasemia- β ⁽²¹⁾.

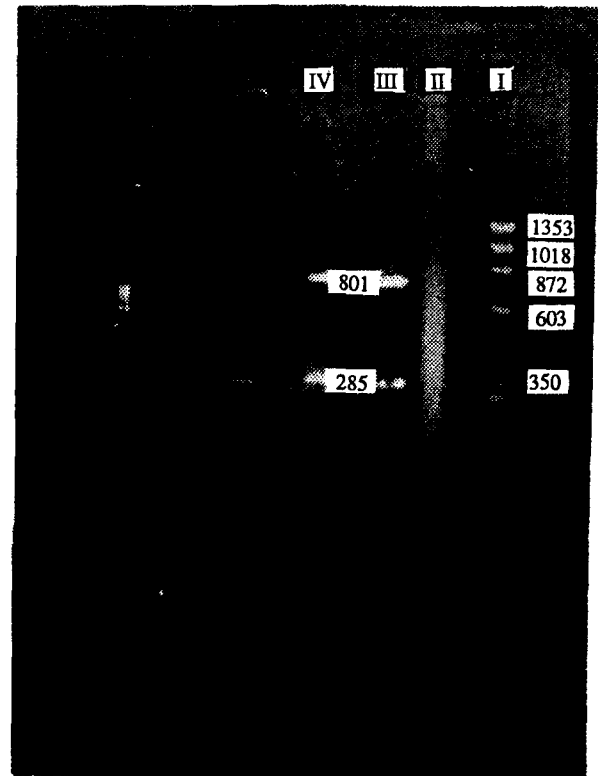
Uji-uji laboratorium di atas diperlukan sesuai dengan kepentingannya seperti dibicarakan di bawah.

TALASEMIA MAYOR

Diagnosis talasemia mayor khususnya talasemia-P^o biasanya tidak sulit, karena gejala kliniknya yang khas berupa kega-



a



b

Gambar 2. Pola elektroforesis DNA hasil PCR prosedur ARMS :

i Marker OX 174 Hae III digested; ii blanko:

- a.
 - iii sampel + primer IVS1-Nt5 mutan → amplifikasi (pita 285bp)
 - iv sampel + primer IVS1-Nt5 normal → amplifikasi negatif
 Kesimpulan : homozigot IVS1-Nt5mutan/IVS1-Nt5mutan
- b.
 - iii sampel + primer IVS1-Nt5 mutan → amplifikasi (pita 285bp)
 - iv sampel + primer IVS1-Nt5 normal → hasil idem
 Kesimpulan : heterozigotIVS1-Nt5mu. n/IVS1-Nt5normal
 Pita 861 bp = hasil amplifikasi dengan primer kontrol (untuk mengontrol apakah PCR efektif).

galan pertumbuhan, anemi sedang sampai berat, mungkin ikterus ringan, wajah mongoloid, *rodent like mouth* mungkin tampak, (hepato) splenomegali yang bisa masif; tulang mengalami perubahan, kortek menjadi tipis, medula porosis. Kedua orang tua sebagai *trait* mempunyai Hb A2 yang meningkat. Elektroforesis memastikan ada/tidaknya HbE atau Hb patologik yang lain.

Untuk pemantauan hemosiderosis perlu pemeriksaan kadar besi serum, kapasitas ikat besi (IBC) laten, kadar feritin. Penimbunan besi pada jaringan dapat dilihat dari pungsi sumsum tulang.

Penderita penyakit tal-R/HbE umumnya memperlihatkan gejala sama dengan talasemia mayor, meskipun lebih ringan. Pada elektroforesis ditemukan HbF meningkat dan pita Hb E.

Diagnosis talasemia mayor dan Hb E cukup dengan uji laboratorium rutin, kadar Hb F, anal isis HbA2 pada orang tua dan mungkin elektroforesis. Dalam praktek analisis sintesis globin tidak dikerjakan terhadap penderita talasemia, tetapi analisis DNA penderita banyak dilakukan karena diperlukan untuk

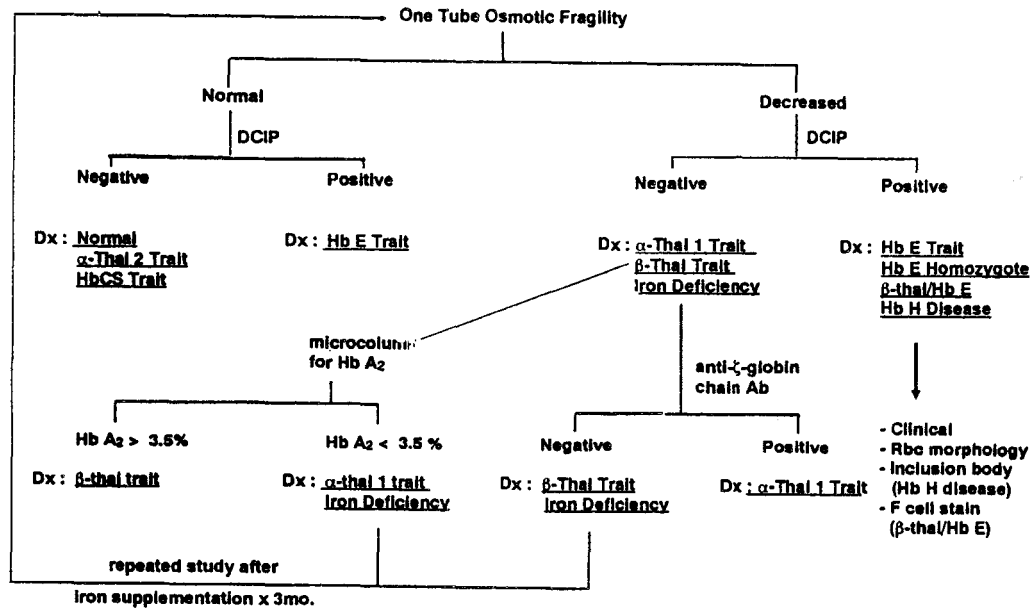
memperoleh informasi, khususnya macam-macam mutasi yang ada pada populasi/ras tertentu^(20,22,23,24,25). Pola mutasi ini sangat diperlukan untuk kepentingan diagnosis prenatal.

TALASEMIA MINOR (HETEROZIGOT, TRAIT ATAU PEMBAWA BAKAT

Talasemia minor tidak menimbulkan masalah klinis, biasanya anemi ringan, kadar Hb rata-rata 1–2 g% di bawah nilai normal, indeks hematologik menunjukkan volume rata-rata eritrosit (MCV) dan hemoglobin per eritrosit rata-rata (MCH) di bawah normal⁽⁴⁾ seperti anemia defisiensi besi. Diagnosis talasemia minor diperlukan untuk mcnerangkan atau meramalkan pola pewarisan pada keluarga dan untuk kepentingan konsultasi pranikah. **Gambar 3** memperlihatkan tata alir penelusuran diagnosis *trait* talasemia.

TALASEMIA INTERMEDIA

Ini suatu istilah klinis untuk bentuk talasemia dengan ber-



Gambar 3. Pola uji saring talasemia di lapangan⁽³⁾

bagai variasi spektrum klinik. Genotipik dapat : talasemia-β⁺, talasemia-σβ dan HPFH, interaksi talasemia-σβ atau dengan Hb S, C, E dan lain-lain, talasemia-β heterozigot berat, talasemia-α, interaksi talasemia-α dengan -β talasemia-α atau -β dengan komplikasi kelainan akuisita⁽¹⁾. Untuk diagnosis kasus-kasus demikian diperlukan analisis DNA dan penelusuran *pedigree*^(1,2).

DIAGNOSIS PRENATAL

Pada penanggulangan talasemia diagnosis prenatal sangat penting peranannya. Diagnosis prenatal dapat dilakukan dengan: 1) analisis sintesis globin *in vitro*, 2) analisis DNA⁽⁹⁾.

Dari 0,5 ml darah fetal yang diperoleh pada *fetal blood sampling* dapat dilakukan analisis sintesis rantai globin. Analisis sintesis globin merupakan uji yang sangat reliabel, sampai 99% ketepatan⁽⁹⁾; sayang *fetal blood sampling* baru dapat dilaksanakan setelah minggu ke-16 kehamilan. Pada janin 9–22 minggu rasio 0/y normal adalah > 0,10, pada *trait* talasemia-3 dan *trait* HbE 0,06–0,10, pada talasemia-β homozigot dan tal-β /HbE 0,03–0,04, pada HbE homozigot 0,045⁽¹⁸⁾.

Penelitian molekular hemoglobin telah demikian maju, sehingga struktur molekular dan urutan DNA Hb normal dan berbagai Hb patologik telah diketahui^(12,26). Ini membawa dampak yang sangat penting bagi diagnosis prenatal, karena dengan ini dimungkinkan menganalisis cuplikan jaringan janin yang dapat diperoleh pada trimester pertama (minggu ke-8) kehamilan dengan *chorionic villus sampling (CVS)*. Dengan prosedur PCR, sejumlah amat kecil dari cuplikan itu dapat diamplifikasi untuk dianalisis. Prosedur diagnosis ini memerlukan waktu hanya 12–24 jam^(18,19). Cara ini dapat digunakan untuk mendeteksi hidrop fetalis Hb Bart dan mutasi talasemia-β.

Bila telah diketahui macam-macam mutasi genetik dalam suatu populasi maka dengan menggunakan primer ARMS yang sesuai adanya mutasi gen dapat diketahui dengan mudah dan cepat^(19,20).

DAMPAK TERHADAP PENANGGULANGAN

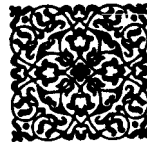
Kemajuan diagnostik talasemia telah memberi manfaat yang nyata pada program penanggulangan talasemia, terutama dalam pencegahan lahirnya bayi talasemia homozigot. Prevensi talasemia pada mulanya tidak efektif, hanya dengan upaya menurunkan lahirnya talasemia homozigot dengan mengubah pola perkawinan antar heterozigot. Studi di Eropa dan Mediterania pada tahun 70-an telah membuktikan bahwa penanggulangan talasemia dengan menyertakan diagnosis prenatal amat efektif⁽⁹⁾. Diagnosis antenatal telah mengurangi 50% kelahiran talasemia homozigot di Yunani, 60% di Sardinia, 92% di Cyprus, 90% di Italia utara dalam 5 tahun^(27,28). Dengan dicapainya kemajuan dalam diagnostik pada trimester pertama kehamilan, 99% dari pasangan di Sardinia mau menerima diagnosis prenatal sebagai cara untuk memantau janin yang menderita talasemia⁽²⁹⁾.

KESIMPULAN

Kemajuan dalam pemahaman patogenesis talasemia, struktur molekular Hb dan kemajuan teknik laboratorium telah membawa kemajuan besar dalam diagnostik talasemia. Diagnostik talasemia makin tinggi sensitivitas dan spesifisitasnya, makin mudah dilaksanakan dan makin praktis untuk dilaksanakan baik untuk kepentingan klinik maupun lapangan. Diagnosis prenatal bermanfaat besar dan selanjutnya membawa dampak keberhasilan mencegah kelahiran talasemia homozigot.

KEPUSTAKAAN

1. Weatherall DJ, Clegg JB. The Thalassemia Syndromes. 3rd ed. London: Blackwell Scient Publ, 1980.
2. Kaufman RE. Analysis of abnormal hemoglobins. In: Kocpke, JA. eds. Practical Hematology. 1st ed. New York: Churchill Livingstone Inc, 1991. pp 251-294.
3. Organizing Committee (eds). Manual of Laboratory Diagnosis. Workshop on Laboratory Diagnosis of Thalassemia and Hemoglobinopathies Including Prenatal Diagnosis. Jakarta, 1992.
4. Bain JB. Screening of antenatal patients in a multiethnic community for β thalassemia trait. J Clin Pathol 1988; 41: 481-5.
5. Conconi F, Bargellesi A, Del Senno L, Menegatti E, Pontremoli S, Russo G. Globin chain synthesis in Sicilian thalassemic subjects. Brit J Haematol 1970; 19: 469-75.
6. Friedman SI-I, Schwartz E, Ahem V, Ahem E. Globin synthesis in the Jamaican Negro with 13-thalassemia. Brit J Haematol 1974; 28: 505-13.
7. Kazazian HH, Ginder GD, Snyder PG, Van Beneden RJ, Woodhead AP. Further evidence of quantitative deficiency of chain-specific globin mRNA in thalassemia syndromes. Proc Natl Acad Sci USA 1975; 72: 567-71.
8. Nienhuis AW, Turner P, Benz Jr EJ. Relative stability of α - and (β -globin messengerRNAs in homozygous β^0 -thalassemia. Proc Natl Acad Sci USA 1977; 74: 3960-64.
9. Wong HB. Prenatal diagnosis of some haematological genetic diseases. Konas V PHTDI - Semarang, 1986.
10. Huang SZ, Zhou XD, Zhu H, Ren ZR, Zeng YT. Detection of β thalassemia mutations in Chinese using amplified DNA from dried blood specimens Hum Genet 1989; 84: 129-31.
11. Todd D, Chan V. The thalassemia an update. Med Progr 1989; 16: 51-62.
12. Bunn HF, Forget BG. Hemoglobin : Molecular, Genetic and Clinical Aspects. 1st ed. Philadelphia: WB Saunders Co, 1986. pp 225-305.
13. Chan F, Chan TK, Kn YW, Todd D. A novel β -thalassemia frameshift mutation (codon 14/15), detectable by direct visualization of abnormal restriction fragment in amplified genomic DNA. Blood 1988; 72: 1420-3.
14. Fucharoen S, Kobayashi Y, Fucharoen G et al. A single nucleotide deletion in codon 123 of β -globin gene cat ses an inclusion body β -thalassaemia trait : a novel elongated globin chain β^{Makabe} . Brit J Haematol 1990; 75: 393-9.
15. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel Set al. Primer directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science 1988; 239: 487-91.
16. Amheim N, Levenson CH. Polymerase chain reaction. C and En: Special Report 1989; 17: 36-47.
17. Wong C, Dowling CE, Saiki RK, Iliguchi RG, Erlich HA, Kazazian Jr HH. Characterization of 5-thalassemiamutations using direct genomic sequencing of amplified single copy DNA. Nature 1987; 330: 384-6.
18. Fucharoen S, Winichagoon P, Thonglairoam V et al. Prenatal diagnosis of thalassemia and hemoglobinopathies in Thailand : Experiences from 100 pregnancies. Southeast Asian J Trop Med Publ Health 1991; 22: 16-29.
19. Old JM, Varawalla NY, Weatherall DJ. Rapid detection and prenatal diagnosis of 13-thalassemia: studies in Indian and Cypriot populations in the UK. Lancet 1990; II: 834-37.
20. Varawalla NY, Old JM, Sarkar R, Venkatesan R, Weatherall DJ. The spectrum of β -thalassemia mutations on the Indian subcontinent: the basis for prenatal diagnosis. Brit J Haematol 1991; 78: 242-7.
21. Lani F. Deteksi Mutasi Gena Penderita Thalassemia- β di RSUP DR Sardjito Yogyakarta. Tesis S2 - UGM 1991.
22. Winichagoon P, Fucharoen S, Thonglairoam V, Tanapotiwirut V, Wasi P. β -thalassemia in Thailand Ann NY Acad Sci 1990; 612: 31-42.
23. Winichagoon P, Thonglairoam V, Fucharoen S, Tanpaichito VS, Wasi P. α -thalassemia in Thailand. Hemoglobin 1988; 12: 485-98.
24. Chan V, Chan TK, Chebab FF, Todd D. Distribution of β -thalassemia mutations in South China and their association with haplotypes. Hum Genet 1987; 41: 678-85.
25. Lie-Injo LE, Cai SP, Wahidiyat I et al. β -thalassemia mutations in Indonesia and their linkage to β -haplotype. Am J Hum Genet 1989; 45: 971-5.
26. Vogel F, Motulsky AG. Human Genetics Problem and Approaches. 2nd ed. Berlin: Springer-Verlag, 1986.
27. WHO. Community control of hereditary anaemias: Memorandum from WHO meeting. Bull WHO 1983; 61:63-80.
28. Angastiniotis MA, Hadjiminias MG. Prevention of thalwemia in Cyprus. Lancet 1981; I: 369-71.
29. Clegg JB. Prenatal diagnosis of haemoglobinopathies. Semiloka Thalassemia : Thalassemia Sebagai Masalah Kesehatan. Yogyakarta, 1993.



Lack of money is the root of all evil
(Mark Twain)