

β -THALASSEMIA TRAIT MENGGUNAKAN ELEKTROFORESIS MIKROKAPILER

(β -Thalassemia Trait Using Capillary Electrophoresis)

Nuryanti, Ratna Akbari Ganle, Adi Koesoema Aman

ABSTRACT

Thalassemia is a genetic disorder disease which spread in the different parts of the world, including Indonesia. The incidence of β -thalassemia trait in Indonesia is between 3–8%. The objective of this study is to know the incidence of β -thalassemia trait in students who performed medical check-up, which obtain by using capillary electrophoresis, to describe the characteristics and to obtain the average value, of MCV, MCH and HbA2. This study was an observational study by cross-sectional method, which was carried out at the Department of Clinical Pathology Haji Adam Malik Hospital in Medan, performed on July to September 2012, consisting of 560 subjects. The examination included FBC to get a microcytic hypochromic sample (MCV <80 fl, MCH <27 pg), then a quantification of HbA2 from microcytic hypochromic sample was done using electrophoresis. From the 560 samples 54% were male and other 46% were female. The average age was 19.25±0.25 years, the percentage based on the races tribe, which including Bataknesse 57.78%, Javanese 15.74%, Acehnesse 10.73, Malay 9.12%, Karonesse 3.93%, Padangnesse 2.32% and Nias 0.35%. The average of the hematological indices, in the 50 subjects were 71.63±7.68 for MCV and 23.27±2.85 for MCH. The quantification of HbA2 in microcytic hypochromic subject showed 10 β -thalassemia trait subject (1.8%) with average of HbA2 (4.34±0.25), MCV (62.66±3.41), and MCH (20.11±2.18) as well as four (4) hemoglobin E subjects (0.7%). Based on this performed research on 560 students with the incidence of β -Thalassemia Trait was 1.8% with the average of HbA2 quantification was 4.34±0.25.

Key words: β -Thalassemia trait, HbA2, capillary electrophoresis

ABSTRAK

Penyakit talasemia merupakan penyakit akibat kelainan genetik yang tersebar di belahan dunia termasuk Indonesia. Angka kejadian β -thalassemia trait di Indonesia berkisar antara 3–8%. Penelitian ini untuk mengetahui cara mendapatkan angka kejadian β -thalassemia trait di mahasiswa yang memeriksakan kesehatan dengan menggunakan elektroforesis mikrokapiler, guna dapat menggambarkan ciri subjek dan mendapatkan nilai rerata MCV, MCH dan HbA2. Penelitian ini merupakan kajian pengamatan dengan metode potong lintang, dilakukan di Departemen Patologi Klinik RSUP Haji Adam Malik Medan, pada bulan Juli–September 2012, dengan jumlah subjek penelitian 560. Pemeriksaan meliputi *full Blood Count* (FBC) untuk mendapatkan sampel mikrositer hipokrom (MCV <80 fl, MCH <27 pg), kemudian diperiksa banyaknya HbA2 di sampel mikrositer hipokrom dengan menggunakan metode elektroforesis mikrokapiler. Dari 560 sampel, dijumpai laki-laki 54% dan perempuan 46%. Mereka rerata berumur 19,25±0,25 tahun, dengan persentase berdasarkan persukuannya, yaitu: suku Batak 57,78%, Jawa 15,74%, Aceh 10,73, Melayu 9,12%, Karo 3,93%, Padang 2,32% dan Nias 0,35%. Hasil memeriksa indeks terkait hematologis, di 50 subjek dengan MCV 71,63±7,68 dan MCH 23,27±2,85, hasil memeriksa terkait banyaknya HbA2 dijumpai 10 yang bernilai HbA2 (4,34±0,25 %) merupakan β -thalassemia trait (1,8 %) dengan MCV (62,66±3,41), MCH (20,11±2,18). Didasari telitian di 560 orang mahasiswa yang telah dilakukan, ditemukan angka kejadian β -Thalassemia Trait 1,8% dengan rerata kadar HbA2 4,34±0,25%.

Kata kunci: β -Thalassemia trait, HbA2, elektroforesis mikrokapiler

PENDAHULUAN

Talasemia merupakan kelainan darah hereditas tertentu yang terjadi karena gangguan buatan rantai α -globin atau β -globin sebagai akibat kurang atau tidak adanya pembuatan dari satu atau lebih rantai polipeptida globin.^{1–3} Penyebaran penyakit talasemia di mulai dari Mediterania, Timur Tengah, India, Burma, serta di daerah yang di sebut kawasan ikat pinggang talasemia (Cina bagian selatan, Thailand,

semenanjung Malaysia, kepulauan Pasifik dan Indonesia).^{1,4} Data terkait epidemiologis β -thalassemia trait di *East Mediterranean* antara 1,5–6%, di Eropa berkisar antara 0,1–15%, *South East Asia* 2,2–16%, Asia Pasifik 0,4–6,8% dan Amerika 0,4–1,3% dari jumlah keseluruhan populasi.⁵ Indonesia termasuk dalam daerah ikat pinggang talasemia. Menurut telitian oleh Sofro⁶ kekerapan pembawa gen talasemia berkisar antara 3–8%, Lanni⁷ di 17 lingkup pasien

yang mewakili di Indonesia menunjukkan pembawa *thalassemia-β* beragam, yaitu 0–10%.^{6,7}

Telitian Ganie⁷, pada tahun 2004, tentang kajian DNA *Thalassemia-α⁰ Southeast Asian Type* di Medan dari 1.521 sampel yang mewakili beberapa suku di kota Medan. Pada penelitian tersebut pemeriksaan untuk terkait banyaknya HbA2 dilakukan dengan metode elektroforesis hemoglobin di pH alkali dalam media membran selulosa asetat (CAM) dengan pewarnaan *Ponceau*. Didasari telitian tersebut ditemukan 117 (7,68%) pembawa talasemia di antaranya: sebanyak 51 (3,35%) berjenis pembawa *thalassemia-α*, 62 (4,07%) *-β* dan empat (4) (0,26%) HbE.⁷

Dalam kajian ini, para peneliti mencoba menapis *β-thalassemia trait* terhadap populasi tertentu dengan pemeriksaan kadar HbA2 melalui metode mikrokapiler elektroforesis dengan menggunakan *Zona Capiler Elektroforesis (CZE)*. Dalam cara ini HbA2 dapat dipisahkan dari HbE, HbC dan HbS.^{8,9} Tujuan penelitian ini untuk mengetahui cara mendapatkan angka kejadian *β-thalassemia trait*, dengan menggambarkan ciri subjek menurut umur, jenis kelamin, suku, serta untuk mendapatkan nilai rerata MCV, MCH dan HbA2.

METODE

Kajian ini merupakan penelitian amatan dengan metode potong lintang, yang dilakukan di Departemen Patologi Klinik RSUP Haji Adam Malik Medan, pada bulan Juli–September 2012. Subjek adalah individu mahasiswa yang memeriksakan kesehatan di laboratorium RSUP Haji Adam Malik Medan dan Laboratorium Paramita Medan sebanyak 560 orang. Seluruh subjek yang bersedia ikut dalam penelitian ini menandatangani surat persetujuan tindakan secara tertulis. Dalam memberikan persetujuan tersebut, sebelumnya telah dijelaskan makna, manfaat dan kemungkinan pengaruh samping yang mungkin dapat terjadi.

Sampel darah lengkap diambil dan diperiksa masing-masing di RSUP Haji Adam Malik Medan dan laboratorium Paramita Medan, kemudian dari yang sampel mikrositer hipokrom dilanjutkan pemeriksaan terkait banyaknya HbA2 dengan menggunakan alat *Mini capillary Electrophoresis* di RSUP Haji Adam Malik Medan. Sampel darah berasal dari mediana cubiti dengan menggunakan wadah hampa udara EDTA 3 mL untuk pemeriksaan *Full Blood Count (FBC)* dengan menggunakan *Sysmex XT 2000i* sebagai penyaringan indeks terkait hematologis untuk mendapatkan sampel mikrositer hipokrom dengan MCV <80 fL, MCH <27 pg (WHO, 1994).⁷ Kemudian

terkait banyaknya HbA2 diperiksa, dengan menggunakan alat *Mini capillary Electro-phoresis* dari Sebia (*Sebia, Norcross, GA*). Dengan cara ini HbA2 dapat dipisahkan dari HbE, HbC dan HbS.⁹ *Cut off* HbA2 sebesar >3,5% untuk mendiagnosis *β-Thalassemia trait*.

Penelitian ini telah mendapatkan persetujuan kepatutan dari Komite Penelitian Bidang Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Sumatera Utara Medan.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Sampel penelitian yang terkumpul sebanyak 560 orang, terdiri dari laki-laki 302 (54%), perempuan 258 (46%), dengan rerata umur 19,25±0,25 tahun. Persentase suku pada penelitian dijumpai suku Batak relatif lebih menonjol yaitu 323 subjek (57,78%).

Dari hasil memeriksa indeks terkait hematologis di Tabel 2, dijumpai 50 sampel mikrositer hipokrom berdasarkan MCV <80 fL dan MCH <27 pg yang merupakan pembawa talasemia tertentu, dengan nilai rerata MCV 71,63±7,68 dan MCH 23,27±2,85.

Di Tabel 3, hasil memeriksa 50 sampel mikrositer hipokrom dijumpai 40 sampel yang berkadar HbA2 ≤3,5%, dengan kemungkinan subjek tersebut mengalami kekurangan besi, *thalassemia-α* dan *β-thalassemia trait* dengan kekurangan besi ataupun normal. Sampel yang berkadar HbA2 >3,5% adalah sebanyak 10 sampel dengan nilai rerata HbA2 (4,34±0,25) yang merupakan *β-thalassemia trait* tertentu dengan persentase 1,8%, dengan rerata hemoglobin 11,68±0,80, MCV 62,66±3,41, MCH 20,11±2,18 dan RDW 17,27±1,99.

Dari Tabel 4 dijumpai rerata nilai Hb A di *β-thalassemia trait* (95,58±0,19) dan HbA2 (4,33±0,25). Pada penelitian ini dijumpai ada hemoglobin E sebanyak empat (4) orang (0,72%)

Tabel 1. Ciri subjek menurut umur, jenis kelamin dan suku yang disertakan dalam penelitian

Ciri	N (560)	%
Umur	19,25±0,25	
Jenis kelamin		
Laki-laki	302	54
Perempuan	258	46
Suku		
Batak	323	57,78
Jawa	88	15,74
Aceh	60	10,73
Melayu	51	9,12
Karo	22	3,93
Padang	13	2,32
Nias	2	0,35

Tabel 2. Hasil memeriksa indeks terkait hematologi

Subjek	MCV <80 fl, MCH <27 pg (mikrositer hipokrom)	MCV >80 fl, MCH >27 pg (nonmikrositer hipokrom)	Nilai P
Jumlah (orang)	50	510	<0,001
Hb (g/dL)	12,54±1,81	14,18±1,25	0,278
WBC (10 ³ /mm ³)	7,986±1,484	7,946±2,273	<0,001
RBC (10 ⁶ /mm ³)	5,40±0,68	4,90±0,41	<0,001
HCT (%)	38,48±4,43	42,16±3,18	<0,001
MCV (fl)	71,63±7,68	85,44±5,95	<0,001
MCH (pg)	23,27±2,85	29,00±1,23	<0,001
MCHC (%)	31,95±1,45	33,61±0,92	<0,001
RDW (%)	16,46±2,73	13,11±0,76	<0,001
PLT (10 ³ /mm ³)	341,080±68,420	282,937±56,000	<0,001

Keterangan: HbA2= hemoglobin adult 2, Hb=hemoglobin, WBC=White Blood Cell, RBC=Red Blood Cell, HCT=hematokrit, MCV=Mean Corpuscular Volume, MCH=Mean Corpuscular Hemoglobin, MCHC=Mean Corpuscular Haemoglobin Concentration, RDW=Red Cell Distribution Width, PLT=platelet. Nilai P bermakna jika <0,05 (didapatkan dengan menggunakan uji Mann Whitney, karena sampel tidak bersebaran normal).

Tabel 3. Gambaran indeks terkait hematologi di sampel mikrositer hipokrom berdasarkan banyaknya HbA2

Subjek	HbA2 ≤3,5%	HbA2 >3,5%	Nilai P
Jumlah (orang)	40	10	
HbA2 (%)	2,19±0,37	4,47±0,48	<0,001*
HGB (g/dl)	13,54±2,03	12,06±0,94	0,03
WBC (10 ³ /mm ³)	7910,75±1382,718	8609,00±1102,06	0,108
RBC (10 ⁶ /mm ³)	5,48±0,67	5,78±0,35	0,195
HCT (%)	41,08±5,05	37,14±2,10	0,02
MCV (fl)	75,07±5,36	64,57±6,25	<0,001*
MCH (pg)	24,72±2,11	21,03±2,58	<0,001
MCHC (%)	32,86±1,26	32,46±1,36	0,384
RDW (%)	15,60±2,42	16,6300±1,87	0,218
PLT (10 ³ /mm ³)	327,475±67,893,95	370,000±57,561,56	0,075

Keterangan: Hb=hemoglobin, WBC=White Blood Cell, RBC=Red Blood Cell, HCT=hematokrit, MCV=Mean Corpuscular Volume, MCH=Mean Corpuscular Hemoglobin, MCHC=Mean Corpuscular Haemoglobin Concentration, RDW=Red Cell Distribution Width, PLT=platelet. Nilai P bermakna jika bernilai <0,05 (didapatkan dengan menggunakan independent t-test dan Mann Whitney (*)).

Tabel 4. Gambaran pemeriksaan hemoglobin elektroforesis di β -thalassemia trait dan yang bukan

β -thalassemia trait (10 orang)		Non β -thalassemia trait (40 orang)	
Hemoglobin (Hb)	Rerata±SB	Hemoglobin (Hb)	Rerata±SB
Hb A	95,58±0,19%	Hb A	96,13±4,35%
Hb F	0,37±0,12%	Hb F	3,62±4,42%
Hb A2	4,34±0,25%	Hb E	22,92±1,23%
		Hb A2	1,90±0,22%

Keterangan: HbA=hemoglobin adult, HbF=hemoglobin fetus, HbA2=hemoglobin adult, 2, HbE=hemoglobin E

dengan nilai rerata Hb E (22,92±1,23), kadar HbE sudah terpisah dengan kadar HbA2.

Pada penelitian ini, para peneliti ingin mengkaji angka kejadian β -thalassemia trait di mahasiswa dengan melihat nilai MCV <80 fl dan MCH <27 pg. Dari 560 subjek mahasiswa yang memeriksakan kesehatan di laboratorium RSUP Haji Adam Malik Medan dan laboratorium Paramita Medan, didapatkan data laki-laki 302 (54%) dan perempuan 258 (46%), yang rerata berusia 19,25±0,25 tahun. Sebaran suku pada penelitian ini dijumpai suku Batak memiliki persentase yang terbesar yaitu 323 subjek (57,78%). Hal ini sejalan dengan penelitian Ganie¹⁶

dengan jumlah suku terbesar suku Batak 503 subjek (33,07%). Ini dimungkinkan karena ada perkawinan antar suku di suku tersebut.⁷ Pada penelitian tersebut pemeriksaan untuk terkait banyaknya HbA2 dilakukan dengan metode elektroforesis hemoglobin di pH alkali dalam media membran selulosa asetat (CAM) dengan pewarnaan Ponceau. Didasar penelitian tersebut ditemukan 117 (7,68%) pembawa talasemia, yang di antaranya sebanyak 51 (3,35%) pembawa talasemia- α , 62 (4,07%) pembawa talasemia- β dan (0,26%) 4 pembawa HbE.⁷

Sejak lama sudah diketahui bahwa metode menapis untuk uji saring awal pembawa sifat talasemia adalah

pengukuran indeks hematologis, yaitu dengan melihat nilai rerata volume sel eritrosit (MCV) dan yang terkait rerata hemoglobin eritrosit (MCH), dengan nilai *cut off* MCV <80 fl dan MCH <27 pg.⁹⁻¹² Ciri eritrosit di pembawa talasemia umumnya mengalami mikrositer hipokrom, sehingga akan dijumpai nilai MCV dan MCH menurun. Didasari penelitian dengan menggunakan *automated hematology cell counter* telah terjaring 50 subjek dari 560 sampel yang mengalami mikrositer hipokrom dan dicurigai sebagai pembawa talasemia, dengan nilai rerata MCV (71,63±7,68) dan MCH (23,27±2,85) (lihat Tabel 4). Dari 50 sampel yang mengalami mikrositer hipokrom 10 orang dinyatakan sebagai β -thalassemia trait tertentu dengan nilai rerata MCV (62,66±3,41) dan MCH (20,11±2,18).

Pembawa sifat talasemia kemungkinan merupakan adanya talasemia- α dan - β . Untuk membedakan talasemia- α dari yang - β , maka dilakukan pemeriksaan hemoglobin elektroforesis. Kadar HbA₂ yang meningkat di seseorang adalah yang secara klinik normal merupakan patokan diagnostik β -thalassemia trait. Di β -thalassemia trait ditentukan berdasarkan kadar HbA₂ dengan *cut off* HbA₂ >3,5%. Pengukuran kadar HbA₂ diakui sebagai pemeriksaan tertentu yang paling penting untuk mengidentifikasi β -thalassemia trait tertentu. Ketepatan pengukuran HbA₂ merupakan prasyarat dalam setiap program penapisan.¹⁰⁻¹⁵ Namun, di beberapa bentuk β -thalassemia heterozigot mungkin memiliki HbA₂ normal atau batas HbA₂.¹⁰ Peningkatan kadar HbA₂ yang terjadi disebabkan karena rantai globin β berkurang, sehingga terjadi imbalan peningkatan gen globin δ dan γ yang terletak di kelompok yang sama dengan gen globin β .⁹ Penetapan fraksi HbA₂ secara kuantitatif dengan ketetapan yang diterima adalah dengan metode elektroforesis media selulosa asetat, kromatografi kolom mikro, HPLC atau dengan mikrokapiler elektroforesis.^{14,15} Pada saat ini telah dikembangkan metode mikrokapiler elektroforesis tertentu yang merupakan teknik khusus yang tepat guna untuk pengukuran fraksi hemoglobin. Dengan metode ini, maka dapat dipisahkan selain hemoglobin normal juga dapat yang terkait fraksi ragam hemoglobin seperti: hemoglobin S, C, E, atau D.

Pada penelitian ini, ada 50 sampel mikrositer hipokrom dan telah dilakukan pemeriksaan hemoglobin elektroforesis dengan *minicapillary electrophoresis* buatan Sebia (*Sebia, Norcross, GA*), dijumpai 10 subjek dengan kadar HbA₂ >3,5% dan nilai rerata HbA₂ 4,34±0,25 (1,8%) yang dinyatakan sebagai β -thalassemia trait. Jika dibandingkan dengan telitian yang dilakukan oleh Ganie, tahun 2004¹⁶ angka kejadian β -thalassemia trait di Medan yang dijumpai

di kajian tersebut adalah sebanyak 4,07%, lebih tinggi daripada penelitian ini. Hal ini disebabkan mungkin oleh karena cara menelitinya yang berbeda, yaitu dalam telitian oleh Ganie,¹⁶ terdiri dari 1.521 subjek penelitian yang berasal dari populasi penyumbang darah yang terdiri dari berbagai macam suku yang diakui bertempat tinggal di kota Medan (Batak, Jawa, Cina, Melayu, Minangkabau, Aceh dan Nias). Pada penelitian tersebut cara memeriksa hemoglobin elektroforesis dengan menggunakan media *cellulose acetat*.¹⁶ Dalam telitian Sofro dan Lanni,⁷ dijumpai persentase β -thalassemia trait di Sumatera khususnya Medan sebesar 1,5%.⁷

Dari 50 subjek mikrositer hipokrom dijumpai 40 yang berkadar HbA₂ ≤3,5% dengan rerata HbA₂ bernilai 1,90±0,22. Dengan melihat kadar HbA₂ yang rendah ≤3,5%, kemungkinan di subjek tersebut ada kekurangan zat besi, *thalassemia- α* dan *β -thalassemia trait* yang kekurangan zat besi ataupun dalam kondisi normal. Dalam β -thalassemia trait dengan kekurangan zat besi kadar HbA₂ akan mengalami penurunan. Namun, pada penelitian ini pengkaji belum dapat membuktikan kekurangan zat besi, karena keterbatasan penelitian ini. Yaitu tidak dilakukan pemeriksaan status zat besi di subjek mikrositer hipokrom. Yang menarik dalam telitian ini, ialah dengan metode *minicapillary electrophoresis* fraksi HbA₂ sudah terpisah dari yang terkait HbE dan sampel mikrositer hipokrom *non β -thalassemia trait* (40 orang). Yaitu di jumpai nilai hemoglobin E sebanyak empat (4) orang (0,71%) dengan nilai rerata HbE (22,92±1,23) dan dinyatakan sebagai Hemoglobin E. Hemoglobin E adalah ragam rantai β yaitu ada kelainan rantai globin β di asam amino ke 26 yang ditandai oleh pergantian asam amino glutamat menjadi lysin ($\alpha 2\beta 2$ ^{26Glu>Lys}). Hal ini terjadi oleh karena ada perpindahan yang mengganggu proses *splicing* dalam pembuatan rantai globin β .^{17,18}

Secara keseluruhan hasil menapis dari 560 sampel darah diperoleh yang berasal dari subjek mikrositer hipokrom sebanyak 50 orang, 1,78% dari yang β -thalassemia trait dan 0,71% dari ragam hemoglobin E.

SIMPULAN

Didasari hasil meneliti ini dapat disimpulkan bahwa kejadian pembawa talasemia dijumpai sekitar 8,94% di mahasiswa yang memeriksakan kesehatannya (560 orang). Setelah diperiksa banyaknya HbA₂ dengan menggunakan mikrokapiler elektroforesis, maka dijumpai rerata kadar HbA₂ 4,34±0,25 (1,78%) yang merupakan β -thalassemia trait tertentu.

DAFTAR PUSTAKA

- Weatherall DJ, Clegg JB. *Thalassemia Syndromes*. 4th Ed., Oxford, Blackwell science, 2001; 3–192.
- Pignatti CB, Galanello R. *Thalassemias and Related disorders: Quantitative Disorders of Hemoglobin Synthesis*. In: *Wintrobe's Clinical Hematology*. 12th Ed., Philadelphia, Lipincot Williams & Wilkins. 2009; 1084–1130.
- Al-Allawi NAS, Jalal SD, Mohammad AM, Omer SQ, and Markous RSD. β -Thalassemia Intermedia in Northern Iraq: A Single Center Experience. *Hindawi Publishing Corporation BioMed Research International* Feb 27, 2014; Volume 2014, Article ID 262853; 1–10. <http://dx.doi.org> on February 27, 2014.
- Langlois S, Ford JC, Chitayat D. Carrier Screening for Thalassemia and Hemoglobinopathies in Canada. *Joint SOGC-CCMG Clinical Practice Guideline* Oct, 2008; 950–959. <http://sogc.org> on October 2008.
- World Health Organization/Thalassemia International Federation. *Prosiding dari: Joint meeting on the prevention and control of haemoglobinopathies*. Nicosia-cyprus: World Health Organization/Thalassemia International Federation, 1994; 20.
- World Health Organization/Thalassemia International Federation. *Prosiding dari: Joint meeting on the prevention and control of haemoglobinopathies*. Nicosia-cyprus: World Health Organization/Thalassemia International Federation, 2007; 1.
- Ganie RA. *Dalam: Kajian DNA thalassemia Alpha di Medan, Medan, USU press*, 2004; 1–4.
- Wirawan R. *Analisa Hemoglobin dengan cara konvensional dan mikroskopis elektroforesis*, Jakarta, Balai Penerbit FKUI, 2011; 59–65.
- Insert Kit Sebia MINICAP HEMOGLOBIN (E) ref.2207, 2008; 13.
- Sanchaisuriya K, Fucharoen S, Fucharoen G, Ratanasiri T, Sanchaisuriya P, *et al*. Reliable Screening Protocol for Thalassemia and Hemoglobinopathies in Pregnancy: An Alternative Approach to Electronic Blood Cell Counting. *Am J Clin Pathol*, 2005; 123(1): 113–118. www.ascpjournals.org on 2005.
- Cao A. Carrier Screening and Genetic Counselling in β -Thalassemia. *International Journal of Hematology* Mar 01, 2002; 76; 105–113. <http://link.springer.com> on Mar 01, 2002.
- Moafi A, Valian S, Nikyar Z, *et al*. Prevalence of Minor β -thalassemia Based on RBC Indices among Final Suspected Individuals in Premarital Screening Program Referred to Genetic Laboratories. *International Journal of Hematology Oncology and Stem Cell Research (IJHOSCR)*, Jan, 2010; 4(1): 23–27.
- Weatherall DJ, Clegg JB. *Thalassemia Syndromes*. 4th Ed., Oxford, Blackwell science. 2001; 597–611.
- Bain BJ, Bate I, Laffan MA, Lewis SM, Dacie and Lewis Practical Haematology. Eleventh Ed., London, Churchill Livingstone Elsevier. 2011; 301–332.
- George E, Jamal A, Khalid F, Osman KA. High Performance Liquid Chromatography (HPLC) As a screening tool for classical beta-thalassemia trait in Malaysia. *Malaysian Journal of Medical Science*, July 2001; 8 (2): 40–46. <http://www.ncbi.nlm> on July, 2001.
- Ganie RA. *Studi DNA Thalassemia- α^0 Southeast Asian Type di Medan*. Naskah Disertasi, Universitas Sumatera Utara, 2004; 79–86.
- Old J, Synodinos JT, Galanello R, Petrou M, Angastiniotis M. *Prevention of Thalassemias and other Haemoglobin Disorders*. Thalassemia International Federation. Nicosia-Cyprus. 2004; 34.
- Bain BJ. *Other significant haemoglobinopathies*. In: *Haemoglobinopathy Diagnosis*. Second Ed., London, Blackwell Publishing, 2006; 190–233.