

Uji Validitas Panel Pemeriksaan *Mean Corpuscular Volume*, Indeks Mentzer dan Fragilitas Osmotik Tabung Tunggal untuk Skrining Talasemia Minor terhadap Pemeriksaan HbA2 Menggunakan *High Performance Liquid Chromatography*

Fridayenti¹, Nadjwa Zamalek Dalimoenthe², Delita Prihatni², Nina Susana Dewi²

ABSTRACT

Thalassemia is a disease caused by reduced or loss of synthesis of globin chains and then hemoglobin becomes abnormal. Characteristic screening in the population needs to be done to prevent marriage among people with thalassemia minor and reduce the birth of babies with thalassemia mayor. Combining several simple tests such as MCV, Mentzer index and single tube osmotic fragility test can increase the effectiveness of the test for screening of thalassemia minor. The purpose of this study was to determine the sensitivity and specificity of each panel for MCV-Mentzer index, MCV-single tube osmotic fragility, and Mentzer index- single tube osmotic fragility test panel against HbA2 in screening for the thalassemia minor. This study is observational with cross-sectional study design. The study was conducted at the Clinical Pathology Laboratory of Arifin Achmad Hospital Pekanbaru in June-August 2020. There were 27 subjects who had MCV values <80 fl out of 230 screened subjects. Then on 27 research subjects were calculated for Mentzer index, single tube osmotic fragility test and HPLC. The research results show the sensitivity, specificity, positive predictive value and negative predictive value of the MCV-Mentzer index panel for screening of thalassemia minor were 11.8%, 90%, 66.7% and 37.5%, respectively. For the MCV-single tube osmotic fragility panel was, respectively, 70.6%, 20%, 60% and 28.6% and for the Mentzer index- single tube osmotic fragility panel was 11.8%, 90%, 66, 7% and 37.5% respectively. The conclusion is that the MCV-single tube osmotic fragility panel has better sensitivity than the MCV-Mentzer index panel or the Menzer index-single tube osmotic fragility panel that it can be used to screen for thalassemia minor in the premarital population in Pekanbaru.

Keywords : HbA2, MCV, Mentzer Index, thalassemia minor screening, osmotic fragility

Talasemia adalah sekelompok kelainan genetik autosomal resesif heterogen yang disebabkan oleh berkurangnya sintesis rantai hemoglobin alfa atau beta yang menyebabkan pembentukan hemoglobin abnormal. Merupakan kelainan hemoglobin bawaan yang disebabkan mutasi atau delesi minimal 1 dari 4 gen globin alfa dan dari 2 gen globin beta.¹ Talasemia tersebar dengan insidensi tinggi pada area yang menyerupai “sabuk” mulai dari daerah Mediteranea dan sebagian Afrika, terus ke Timur Tengah, India, Asia Tenggara, Melanesia dan Kepulauan Pasifik. Frekuensi pembawa sifat talasemia beta di area ini berkisar antara 1%-20% sementara talasemia alfa

lebih tinggi, berkisar 10-20% di Afrika, 40% atau lebih di beberapa negara Timur Tengah dan India dan hingga 80% di Utara Papua New Guinea dan Timur Laut India. Data frekuensi talasemia yang dipublikasikan pada tahun 2001 oleh *World Health Organization* (WHO) memperlihatkan bahwa setiap tahun sekitar 270 juta *carrier* baru talasemia muncul dan 300.000 - 400.000 kelahiran bayi dengan anemia sel sabit atau bentuk yang berat dari talasemia terutama daerah Asia Tenggara disusul Afrika.²

Hemoglobinopati merupakan kelainan genetik tersering ditemukan pada penduduk Asia Tenggara. Lima puluh persen populasi dunia dengan talasemia beta diperkirakan berada di Asia Tenggara. Frekuensi gen talasemia alfa mencapai 30-40% di bagian Utara Thailand dan Laos, 4,5% di Malaysia dan 5% di kepulauan Filipina sementara talasemia beta bervariasi antara 1-9%. Hemoglobin E merupakan ciri khas Asia Tenggara dengan frekuensi gen

* Corresponding author : fridayenti@yahoo.co.id

¹ PPDS2 Patologi Klinik, Fakultas Kedokteran Universitas Padjadjaran, Bandung, Jawa Barat, Indonesia

² Bagian Patologi Klinik dan Kedokteran Laboratorium, Fakultas Kedokteran Universitas Padjadjaran, Bandung, Jawa Barat, Indonesia

50-60% pada daerah segitiga Thailand, Laos dan Kamboja. Kombinasi dari berbagai gen abnormal yang berbeda ini menyebabkan munculnya lebih dari 60 sindrom talasemia yang berbeda sehingga membuat Asia Tenggara merupakan wilayah dengan genotipe talasemia yang paling kompleks.³

Frekuensi talasemia di Indonesia berkisar antara 0-11%.² Berdasarkan data Yayasan Talasemia Indonesia/ Perhimpunan Orang Tua Penderita (YTI/POPTI), penyandang talasemia di Indonesia mengalami peningkatan yaitu dari 4.896 penyandang di tahun 2012 menjadi 9.028 pada tahun 2018. Pria dan wanita mempunyai kesempatan yang sama menderita talasemia.^{2,4}

Terdapat dua bentuk utama talasemia yaitu talasemia alfa dan beta tergantung kepada rantai globin mana yang sintesisnya terganggu. Gen globin alfa mempunyai 4 *allele* dan derajat penyakit dari ringan sampai berat tergantung jumlah *allele* yang hilang. Talasemia beta disebabkan mutasi *point* gen beta. Mutasi heterozigot (talasemia beta⁺) menyebabkan berkurangnya sintesis rantai globin beta, mutasi homozigot (talasemia beta⁰) menyebabkan hilangnya semua rantai beta. Berdasarkan gambaran klinis dan pemeriksaan hematologis, talasemia dibagi menjadi talasemia mayor, talasemia intermedia dan talasemia minor.⁵

Empat penyakit talasemia utama adalah Hb Bart's *hydrops fetalis* (talasemia alfa homozigot), talasemia beta homozigot, talasemia beta/Hb E dan HbH. Talasemia beta homozigot menyebabkan penyakit talasemia yang berat dimana sebagian besar pasien meninggal pada dekade pertama kehidupan. Pasien dengan talasemia beta/ Hb E mengalami anemia yang bervariasi dan beberapa mengalami anemia berat sama seperti talasemia beta homozigot. Manifestasi klinis talasemia alfa bervariasi dari asimtomatik sampai sindrom yang mematikan. Keadaan ini menyebabkan talasemia menjadi masalah kesehatan masyarakat yang utama khususnya di negara-negara Asia Tenggara.^{3,5}

Talasemia merupakan penyakit yang diturunkan dari orang tua kepada anaknya melalui gen sesuai hukum Mendel. Individu yang mewarisi gen globin yang mengalami mutasi dari salah satu orang tua, namun gen yang lainnya normal disebut penderita talasemia *carrier* atau talasemia minor atau talasemia *trait* atau talasemia heterozigot. Penderita

talasemia minor tidak menunjukkan gejala dan tidak memerlukan terapi, tetapi dapat mewariskan gen yang abnormal kepada anak-anaknya. Jika pasangan sesama talasemia *carrier* memiliki anak, maka 25% kemungkinan pada setiap kehamilan mempunyai bayi yang lahir dengan bentuk yang berat dari talasemia.⁶

Dengan demikian, sudah waktunya menerapkan strategi untuk pencegahan dan kontrol talasemia termasuk skrining pembawa sifat pada populasi, konseling genetik dan diagnosis fetal. Terdapat cukup bukti bahwa program skrining dan pencegahan efektif dalam mengontrol talasemia beta minor. Skrining yang efektif adalah pada anak sekolah usia 15-16 tahun, *premarital* dan skrining antenatal pada penderita talasemia *carrier* dengan kehamilan. Program skrining pada populasi muda (skrining *premarital*) adalah penting untuk mengidentifikasi *carrier* sehingga dapat mencegah pernikahan sesama *carrier* yang berisiko mempunyai anak menderita talasemia mayor, bentuk yang berat dari penyakit ini. Skrining dapat dilakukan di universitas, sekolah atau pusat kesehatan masyarakat. Pendekatan skrining ini relevan dilakukan pada komunitas risiko tinggi pada daerah dengan prevalensi tinggi. Program skrining talasemia minor telah ada sejak bertahun-tahun yang lalu. Namun strategi skrining sangat tergantung kepada frekuensi penyakit, heterogenitas populasi dan defek genetik, sumber daya yang tersedia dan faktor sosial, kultural dan agama.^{3,7}

Terdapat lebih dari 200 mutasi titik dan delesi dalam berbagai derajat pada gen globin beta. Perbedaan tipe mutasi menyebabkan manifestasi klinis dan hematologik yang beratnya bervariasi termasuk pada talasemia beta minor. Kegagalan sintesis rantai globin dan berkurangnya sintesis hemoglobin menyebabkan eritrosit menjadi mikrositik dan hipokromik.^{8,9}

Talasemia alfa biasanya disebabkan oleh berkurangnya produksi (a⁺) atau hilangnya produksi (a⁰) rantai globin. Keadaan *carrier* dapat berupa talasemia *trait* (a⁺) (talasemia alfa 2) atau talasemia *trait* (a⁰) (talasemia alfa 1). Talasemia alfa 2 tidak menunjukkan gejala, ditandai dengan sel darah merah yang sedikit mikrositik atau bahkan normal. Talasemia alfa 1 ditandai anemia ringan, nilai MCV dan MCH sedikit berkurang dan hitung jumlah eritrosit sedikit meningkat.^{8,9}

Beberapa prosedur telah diajukan untuk skrining *carrier* talasemia beta. Prosedur yang paling murah dan sederhana adalah berdasarkan nilai MCV dan MCH yang kemudian dilanjutkan dengan mengukur kadar HbA2 terhadap subjek dengan MCV dan MCH yang rendah. Tujuan penggunaan indeks eritrosit ini untuk mendeteksi subjek yang sangat mungkin memerlukan pemeriksaan lanjutan dan untuk mengurangi biaya investigasi yang tidak diperlukan. Nilai MCV yang normal dapat menyingkirkan adanya talasemia minor.^{8,9}

Penentuan nilai MCV dan MCH menggunakan alat hematologi otomatis menjadi indikator pertama menentukan talasemia beta. Pemeriksaan ini mempunyai banyak keuntungan yaitu cepat, murah, bisa dikerjakan dalam jumlah yang banyak dan hasil yang akurat sehingga sering digunakan di negara-negara miskin dan berkembang. Nilai *cut-off* MCV dan MCH untuk menentukan talasemia adalah 80 fl dan 27 pg.^{8,9} Namun pemeriksaan ini tidak dapat membedakan talasemia dengan kekurangan besi yang sama-sama mikrositik hipokrom. Metoda definitif untuk membedakan keduanya adalah pengukuran kuantitatif HbA2 dan analisis mutasi DNA.¹⁰

Pengukuran kuantitatif HbA2 merupakan tes yang paling berguna untuk mendeteksi talasemia beta *carrier*. Terdapat beberapa metoda, yang paling akurat, cepat dan sederhana adalah *microchromatography*, *the cation exchange HPLC* dan *capillary electrophoresis*. *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC) merupakan metoda yang sensitif dan akurat untuk mengidentifikasi HbA2, HbF dan hemoglobin abnormal. Merupakan metoda pilihan untuk skrining talasemia karena cepat dan reliabel.¹⁰ Meskipun lebih akurat, tetapi pemeriksaan ini mahal dan memerlukan waktu yang lama sehingga tidak tepat digunakan sebagai pemeriksaan awal pada skrining populasi.

Parameter dan formula yang berbasis hitung eritrosit seperti MCV dan jumlah eritrosit seperti Indeks Mentzer mempunyai kemampuan yang baik membedakan talasemia dan kekurangan besi. Banyak penelitian menemukan bahwa Indeks Mentzer merupakan salah satu indeks yang dapat diandalkan membedakan kedua keadaan ini. Penelitian yang dilakukan oleh Arora dan kawan-kawan tahun 2018 di India menemukan Indeks

Mentzer <13 mempunyai sensitivitas 97,62% dan spesifisitas 66,67% mendeteksi anemia defisiensi besi.¹¹

Vehapoglu A dan kawan-kawan memperlihatkan indeks terbaik membedakan talasemia minor dan kekurangan besi sesuai kriteria Youden adalah Indeks Mentzer.¹² Demikian juga, hasil yang sama ditemukan oleh Ghafouri *et al*, Indeks Mentzer mempunyai sensitivitas 90,9% dan spesifisitas 80,3%.¹³ Namun demikian, walau semua formula telah diuji dengan berbagai nilai *cut-off*, tidak satupun yang cukup sensitif atau spesifik apabila dihubungkan dengan jenis mutasi pada daerah tertentu. Pada sisi lain, setiap mutasi mempengaruhi sejumlah tertentu sintesis rantai globin dan menimbulkan perubahan indeks eritrosit. Oleh sebab itu, sejumlah laboratorium mengkombinasikan beberapa tes untuk meningkatkan efektivitas skrining.¹

Telah diketahui bahwa tes fragilitas osmotik tabung tunggal dengan larutan salin 0,36% merupakan salah satu tes alternatif yang menarik untuk mengidentifikasi *carrier* talasemia α dan β . Skrining dengan tes ini cukup sensitif mendeteksi sebagian besar kasus talasemia alfa 1 dan talasemia beta trait. Merupakan tes yang sederhana, berbiaya rendah, cepat dan dapat dipercaya sebagai tes skrining masal talasemia minor namun kurang spesifik karena dapat positif pada beberapa keadaan seperti defisiensi besi.¹⁴ Beberapa penelitian memperlihatkan kombinasi tes fragilitas osmotik tabung tunggal dengan MCV < 80 fl mempunyai sensitivitas sempurna yaitu 100% dibanding hanya tes fragilitas osmotik saja. Kombinasi ini memenuhi kriteria tes skrining yang ideal.¹⁴ Belum ada laporan penelitian tentang sensitivitas dan spesifisitas kombinasi tes fragilitas osmotik tabung tunggal dengan formula berbasis jumlah dan indeks eritrosit seperti indeks Mentzer pada skrining talasemia minor.

Berdasarkan hal tersebut di atas, penulis tertarik mengadakan penelitian menguji metoda tes dalam bentuk kombinasi yaitu panel MCV dan indeks Mentzer, panel MCV dan fragilitas osmotik, panel indeks Mentzer dan fragilitas osmotik yang murah dan mudah untuk skrining talasemia dan dibandingkan dengan metoda standar HPLC pada populasi premarital di Pekanbaru.

METODE

Bentuk penelitian ini adalah observasional dengan rancangan *cross sectional study*. Selanjutnya dilakukan uji diagnostik tabel 2x2 dari Thorner-Remain untuk menentukan sensitivitas dan spesifisitas panel pemeriksaan untuk skrining talasemia minor. Subjek penelitian ini adalah seluruh mahasiswa Akademi Analis Kesehatan John Paul II Pekanbaru dan peserta pendidikan Kepaniteraan Klinik Fakultas Kedokteran Universitas Riau/RSUD Arifin Achmad Pekanbaru tahun 2020 yang bersedia menjadi subjek penelitian. Bahan penelitian ini berupa data elektronik hasil pemeriksaan sampel darah dari subjek penelitian untuk pemeriksaan hematologi (hemoglobin, jumlah eritrosit, hematokrit, Nilai MCV, Nilai MCH) menggunakan alat *hematology analyzer*, penghitungan indeks Mentzer secara manual dengan rumus MCV/jumlah eritrosit (juta), pemeriksaan fragilitas osmotik tabung tunggal dan pengukuran kadar HbA2 menggunakan HPLC di Laboratorium Patologi Klinik RSUD Arifin Achmad Pekanbaru. Jumlah sampel minimum yang diperlukan untuk menilai sensitivitas dan spesifisitas tes dihitung menggunakan software PASS.¹⁵ Jumlah total sampel yang diperlukan adalah minimal 200 orang.

Kriteria inklusi subjek penelitian ini adalah semua mahasiswa Akademi Analis Kesehatan John Paul II Pekanbaru dan peserta pendidikan Kepaniteraan Klinik Fakultas Kedokteran

Universitas Riau/RSUD Arifin Achmad Pekanbaru tahun 2020 yang bersedia menjadi subjek penelitian, menderita talasemia minor yang dibuktikan dari hasil pemeriksaan laboratorium yaitu nilai MCV < 80 fL, indeks Mentzer <13 dan kadar HbA2 >3,2%. Kriteria eksklusi subyek penelitian ini adalah mahasiswa yang menderita anemia sedang dan berat dibuktikan dengan hasil pemeriksaan hematologi rutin (Hemoglobin).

Data hasil pemeriksaan MCV, MCH, indeks Mentzer, fragilitas osmotik dan HbA2 dianalisis menggunakan metode *Screening Test Thorner-Remain* yang merupakan alat konfirmasi diagnosis tabulasi 2x2 yang menghasilkan nilai sensitivitas dan spesifisitas, nilai prediktif dan prevalensi.¹⁶ Semua data kemudian diolah secara manual. Penelitian ini telah lulus kaji etik oleh Unit Etika Penelitian Kedokteran dan Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Riau dengan nomor B/078/UN19.5.1.1.8/UEPKK/2020.

HASIL

Distribusi Subyek Penelitian

Jumlah subjek penelitian yang diskriming adalah sebanyak 230 orang dan yang mempunyai nilai MCV <80 fl adalah 27 orang, dan 27 orang ini yang menjadi sampel penelitian. Karakteristik subyek penelitian dapat dilihat pada tabel 1.

Tabel1. Karakteristik Subjek Penelitian

Variabel	n (%) N=27
Umur (tahun)	
- <18	1 (3,7)
- 18-25	26 (96,3)
Jenis Kelamin	
- Laki laki	0 (0)
- Perempuan	27 (100)

Pada tabel 1 terlihat bahwa subjek penelitian 96,3% berumur antara 18-25 tahun dan satu orang berumur < 18 tahun dan memerlukan *informed consent* dari orang tua. Semua yang positif adalah perempuan.

Distribusi nilai MCV, Indeks Mentzer dan Tes Fragilitas Osmotik Tabung Tunggal

Distribusi nilai MCV, Indeks Mentzer dan Tes Fragilitas Osmotik Tabung Tunggal pada subyek penelitian dapat dilihat pada tabel 2.

Tabel 2. Distribusi nilai MCV, Indeks Mentzer dan Tes Fragilitas Osmotik Tabung Tunggal

Variabel	Total N=27 n (%)
Indeks Mentzer	
- < 13	3 (11,1)
- >13	24 (88,9)
Fragilitas Osmotik Tabung Tunggal	
- Positif	20 (74,1)
- Negatif	7 (25,9)
Kadar HbA2	
- Meningkatkan	17 (63)
- Normal	10 (37)

Pada tabel 2 terlihat bahwa 88,9% subjek penelitian mempunyai indeks Mentzer >13. Tes fragilitas osmotik positif pada 74,1% subjek dan kadar HbA2 meningkat pada 63% subjek penelitian.

Nilai MCV, Indeks Mentzer dan Tes Fragilitas Osmotik TabungTunggal pada Penderita Talasemia β Carrier (HbA2 >3,2%) dan Bukan Penderita Talasemia β Carrier (HbA2 \leq 3,2%)

Tabel 3. Nilai MCV, Indeks Mentzer dan Tes Fragilitas Osmotik TabungTunggal pada Penderita Talasemia β Carrier (HbA2 >3,2%) dan Bukan Penderita Talasemia β Carrier (HbA2 \leq 3,2%)

Hasil HPLC	Indeks Mentzer		Tes Fragilitas Osmotik Tabung Tunggal	
	<13 n (%)	\geq 13 n (%)	Positif n(%)	Negatif n(%)
>3,2%	2 (7,4)	15 (55,6)	12 (44,4)	5 (18,5)
\leq 3,2%	1 (3,7)	9 (33,3)	8 (29,6)	2 (7,4)

Pada tabel 3 ditemukan pada kadar HbA2 > 3,2%, yang mempunyai indeks Mentzer <13 hanya 7,4%. Sementara ditemukan subjek dengan kadar HbA2 \leq 3,2% tetapi mempunyai indeks Mentzer <13 adalah sebanyak 3,7%. Tes Fragilitas osmotik tabung tunggal yang positif pada subjek dengan kadar HbA2 >3,2% adalah 44,4%. Ditemukan juga tes fragilitas osmotik tabung tunggal yang positif pada subjek

dengan kadar HbA2 \leq 3,2% sebanyak 29,6%. Tes Fragilitas osmotik tabung tunggal yang negatif pada subjek dengan kadar HbA2 >3,2% adalah 18,5%.

Uji Validitas

Hasil pengujian validitas dapat dilihat pada tabel 4.

Tabel 4. Nilai Sensitivitas, Spesifisitas, Nilai Prediksi Positif, Nilai Prediksi Negatif Masing Masing Panel

Variabel	Panel 1	Panel 2	Panel 3
Sensitivitas	11,8%	70,6%	11,8%
Spesifisitas	90%	20%	90%
Nilai Prediksi Positif	66,7%	60%	66,7%
Nilai Prediksi Negatif	37,5%	28,6%	37,5%

Pada tabel 4 terlihat bahwa sensitivitas panel 2 sebesar 70,6%. Spesifisitas panel 1 dan panel 3 adalah 90%. Nilai prediksi positif panel 1 dan panel 3 sama yaitu 66,7%. Nilai prediksi negative panel 1 dan panel 3 sama yaitu 37,5%.

PEMBAHASAN

Pemeriksaan hematologi lengkap telah dilakukan pada 230 orang sehat dan diperoleh 27 orang mempunyai nilai MCV <80 fl yang berarti 11,7 % dari total sampel. Selanjutnya dilakukan

pengukuran kadar HbA2 pada sampel yang positif dengan metoda HPLC. Terdapat 17 orang mempunyai kadar HbA2 yang meningkat yaitu 7,4% dari total sampel yang dapat menggambarkan prevalensi talasemia minor di Pekanbaru. Hal ini berbeda dengan hasil penelitian yang dilakukan oleh Husna N dan kawan kawan yang menemukan prevalensi talasemia minor adalah 31.1%. Penelitian dilakukan pada tahun 2012-2015 di Daerah Istimewa Yogyakarta.¹⁷ Penelitian yang sama di Medan pada tahun 2012 oleh Nuryanti dan kawan kawan menemukan prevalensi talasemia beta minor adalah 1,8%.¹⁸ Melihat keadaan ini terlihat bahwa prevalensi talasemia minor berbeda beda pada setiap wilayah di Indonesia. Secara keseluruhan prevalensi talasemia minor di Indonesia berkisar antara 0-11%.²

Nilai MCV yang rendah menggambarkan bahwa sel darah merah penderita berukuran kecil atau mikrositik. Hal ini umumnya ditemukan pada penderita talasemia dan anemia defisiensi besi. Terdapat perbedaan nilai *cut-off* MCV dan MCH untuk skrining talasemia yang mungkin disebabkan perbedaan karakteristik populasi seperti usia dan ras. Pada penelitian ini nilai *cut-off* untuk MCV adalah 80 fl dan MCH 27 pg. Penelitian yang dilakukan oleh Madan dan kawan kawan tahun 1999 di Delhi, MCV <80 fL dan MCH <27 pg merupakan marker yang sangat sensitif untuk mendeteksi talasemia beta minor, walaupun disertai defisiensi besi (P<0,0001).¹⁹ Penelitian oleh Sirichotiyakul S dan kawan kawan tahun 2002 di Thailand menyatakan bahwa MCV berguna untuk skrining talasemia a 1 dan talasemia b *carrier* dengan sensitivitas 92,9% dan spesifisitas 83,9% pada *cut-off* < 80 fl.²⁰

Hasil penghitungan sensitivitas dan spesifisitas panel 1 (MCV- indeks Mentzer) adalah 11,8% dan 90% secara berturut. Terlihat bahwa panel ini tidak sensitif untuk skrining talasemia minor namun cukup spesifik. Hal ini sangat jauh berbeda dengan hasil penelitian yang dilakukan oleh Vehapoglu dan kawan kawan di Turki pada tahun 2014. Pada penelitian tersebut, indeks Mentzer sebagai nilai tunggal merupakan metoda yang paling *reliabel* untuk mendeteksi talasemia beta *trait* dibanding formula indeks eritrosit lainnya dengan sensitivitas, spesifisita dan indeks Youden yang tinggi secara berturut 98%, 82,3% dan 81%.¹²

Penelitian oleh Bose di India tahun 2018 memperlihatkan bahwa indeks Mentzer mempunyai sensitivitas 85% dan spesifisitas 90% dalam menentukan talasemia beta minor.²¹ Terdapat perbedaan sensitivitas yang cukup signifikan dengan hasil penelitian ini meskipun mempunyai spesifisitas yang sama. Faktor yang dapat menimbulkan hal ini adalah:

- Sebagian besar subjek penelitian merupakan penderita talasemia minor yang mengalami defisiensi besi secara bersamaan
- Nilai *cut-off* MCV yang tinggi
- Nilai *cut-off* kadar HbA2 yang rendah

Sensitivitas panel 1 yang rendah pada penelitian ini mungkin disebabkan sebagian besar subjek yang positif talasemia juga mengalami anemia defisiensi besi (IDA). Talasemia beta minor yang berkombinasi dengan IDA mengalami perbedaan bermakna jumlah eritrosit, kadar hemoglobin dan RDW dibanding talasemia beta minor klasik. Rathod DA dan kawan kawan menemukan sensitivitas indeks Mentzer yang jauh berbeda untuk skrining talasemia beta minor klasik dibanding talasemia beta minor + IDA secara berturut yaitu 92% dan 53% dengan spesifisitas yang sama sama 100%. Sementara sensitivitas nilai MCV untuk skrining talasemia beta minor klasik 93,7% tidak jauh berbeda dengan talasemia beta minor + IDA 94,82% dengan nilai *cut-off* nilai MCV <76 fl. Ricerca dan indeks Green mendeteksi 92,9% dan 92,9% pada kasus talasemia beta minor klasik dan 43% dan 55% secara berturut pada kasus talasemia beta minor + IDA.²²

Prevalensi defisiensi besi, asam folat dan vitamin B12 bersamaan dengan penyakit kronik pada populasi yang tinggi di Indonesia mempengaruhi parameter dan indeks darah. Dengan demikian nilai *cut-off* harus direvisi menggunakan analisis kurva ROC. Nilai *cut-off* juga tergantung kepada prinsip alat yang digunakan. Kotwal dan kawan kawan melaporkan revisi nilai *cut-off* untuk populasi India terhadap MCV (≤ 76 fl), jumlah eritrosit ($\geq 4.9 \times 10^6/\mu\text{L}$) dan RDW ($\geq 18\%$). Lafferty dan kawan kawan mengajukan revisi *cut-off* untuk MCV (<72 fl) dengan analisis kurva ROC. Penelitian ini juga sebaiknya melakukan revisi nilai *cut-off* parameter dan indeks yang digunakan dan ini menjadi kelemahan penelitian.²²

Kadar HbA2 >3,5% merupakan diagnostik talasemia beta minor. Pada beberapa program skrining talasemia beta minor, tidak jarang ditemukan individu dengan kadar HbA2 *borderline* (3,2- 3,4%) dengan nilai MCV dan MCH yang sedikit rendah atau normal. Hal ini merupakan masalah dalam identifikasi talasemia *carrier*. Mayoritas kasus kadar HbA2 *borderline* dengan indeks eritrosit sedikit rendah mempunyai gen globin a dan b yang normal, dengan demikian kadar HbA2 yang *borderline* termasuk dalam rentang normal. Namun demikian, kadang kasus ini disebabkan defisiensi besi, talasemia *a trait* dan talasemia *db+* atau mutasi talasemia silent (-101C T, IVSII-844C G, +33C G) atau *triplicated* lokus gen alfa.²³

Talasemia beta *carrier* yang bersamaan dengan defisiensi besi, kadar HbA2nya mungkin berkurang meskipun biasanya masih berada dalam rentang nilai talasemia *carrier*. Pengecualian kasus talasemia beta *carrier* yang mengalami defisiensi besi yang sangat berat, kadar HbA2nya bisa berada dalam rentang normal. Dalam praktik klinis, jika individu mengalami anemia defisiensi yang sangat berat dengan kadar HbA2 normal, dianjurkan untuk mengobati pasien dengan preparat besi untuk mengoreksi anemia sebelum mengulangi pengukuran kadar HbA2.²³

Penelitian ini menggunakan kadar HbA2 >3,2% dengan kadar MCV <80 fl sebagai diagnostik talasemia beta minor, lebih rendah dari nilai diagnostik kadar HbA2 >3,5% yang digunakan peneliti lain. Penelitian ini membuktikan bahwa nilai cut-off kadar HbA2 >3,2% ini menyulitkan untuk mendapatkan kasus talasemia beta minor yang positif benar karena tumpang tindih dengan kasus non talasemia beta minor yang mempunyai kadar HbA2 dalam rentang yang sama sehingga menurunkan spesifisitas. Tetapi sebaliknya penggunaan nilai cut-off ini seharusnya meningkatkan sensitivitas karena kasus kasus talasemia minor lainnya atau talasemia beta minor yang mengalami mutasi dapat disaring tetapi tidak terbukti dalam penelitian ini (sensitivitas rendah). Hal ini mungkin disebabkan prevalensi kasus kasus tersebut tidak tinggi di masyarakat. Perlu penelitian lebih lanjut tentang hal ini. Dengan demikian perlu dilakukan analisis DNA untuk menemukan mutasi atau delesi gen alfa dan beta khususnya pada individu yang mempunyai kadar HbA2 antara 3,2-2,5% agar dapat menentukan

nilai *cut-off* kadar HbA2 pada populasi Pekanbaru. Analisis DNA tidak dilakukan pada penelitian ini.

Sensitivitas dan spesifisitas panel 2 adalah 70,6% dan 20% dan panel 3 adalah secara berturut 11,8% dan 90% . Beberapa penelitian serupa telah dilakukan sejak tahun 1981- 2016. Semua study meneliti tentang fragilitas osmotik tabung tunggal, hematologi lengkap dan analisis Hb dan memperlihatkan sensitivitas fragilitas osmotik tabung tunggal yang bervariasi, berkisar antara 78,4 -100% dan spesifisitas antara 63,38- 100%.²⁴

Terdapat perbedaan populasi target pada laporan penelitian tersebut. Kattamis *et al*, yang pertama menemukan tes fragilitas osmotik tabung tunggal untuk skrining talasemia beta *carrier* dengan berbagai konsentrasi larutan salin yang berbeda dan menemukan bahwa konsentrasi 0,36% merupakan konsentrasi terbaik mendeteksi talasemia minor. Penelitian dilakukan secara serial di tiga negara yaitu Yunani (series Gr), Yugoslavia (series Y) dan Thailand (series T) pada tahun 1981.²⁵

Penelitian terbaru yang sama dilakukan oleh Sorathiya VP pada bulan Maret 2020 di India. Penelitian ini menggunakan tes fragilitas osmotik tabung tunggal, MCV, MCH, indeks Mentzer sebagai alat skrining talasemia beta *trait* di populasi. Dari 1000 subjek penelitian yang dilakukan skrining, 78 individu terdiagnosis talasemia β *trait* (7,8%) menggunakan HPLC sebagai baku emas dengan kadar HbA2 $\geq 4.0\%$.²⁴ Sedikit berbeda dengan penelitian ini yang menemukan 27 dari 230 subjek (11,7%), menggunakan HPLC sebagai baku emas dengan kadar HbA2 >3,2%. Perbedaan ini dapat disebabkan karena perbedaan nilai cut-off kadar HbA2 yang digunakan. Rentang nilai rujukan normal untuk HbA2 dipengaruhi oleh jenis kelamin, kehamilan, status penyakit, ras, regio geografik dan metoda deteksi sehingga nilai cut-off HbA2 dapat bervariasi pada populasi yang berbeda dan pada laboratorium berbeda.²⁶

Sensitivitas, spesifisitas, nilai prediksi positif dan nilai prediksi negatif tes fragilitas osmotik tabung tunggal pada penelitian tersebut secara berturut adalah 94,87%, 85,38%, 35,75 dan 99,49%. Untuk nilai MCV dan MCH secara berturut adalah 98,71%, 65,6%, 19,74% dan 99,83% dan indeks Mentzer 78,2%, 97,8%, 75,3% dan 98,12%. Masing masing variabel penelitian dihitung terpisah, bukan

berupa panel.²⁴ Terlihat bahwa sensitivitas dan spesifisitas tes fragilitas osmotik dan MCV, MCH tinggi. Hal yang berbeda dengan penelitian ini bahwa hanya tes fragilitas osmotik pada nilai MCV <80 fl yang menunjukkan sensitivitas yang cukup baik yaitu 70,6% tetapi mempunyai spesifisitas yang sangat rendah yaitu 20%. Hal ini dimungkinkan karena tes fragilitas osmotik juga positif pada anemia defisiensi besi yang mungkin terdapat pada sebagian besar subjek penelitian ini (talasemia minor kombinasi defisiensi besi). Hal ini harus dibuktikan lebih lanjut dengan menilai status besi penderita.

Sensitivitas panel yang memuat indeks Mentzer (<13) yaitu panel 1 dan 3 mempunyai sensitivitas yang sangat rendah. Sedikit berbeda dengan hasil penelitian oleh Shorathiya et al yang menemukan sensitivitas indeks Mentzer lebih tinggi walau tidak setinggi sensitivitas tes fragilitas osmotik tabung tunggal dan MCV tetapi spesifisitas sama sama tinggi diatas 90%. Ketiga panel menunjukkan nilai prediksi positif yang hampir sama antara 60-66,7% sedikit lebih tinggi daripada nilai prediksi negatif yang berkisar 28-37,5%. Berbeda dengan hasil penelitian Sorathiya dan kawan kawan, nilai prediksi positif lebih rendah yaitu 35,75% daripada nilai prediksi negatif 99,49%.

Hasil penelitian ini tentang tes fragilitas osmotik tabung tunggal, MCV dan indeks Mentzer pada individu dengan talasemia β carrier (HbA2 >3,2%) dibanding dengan individu yang bukan penderita talasemia β carrier (HbA2 \leq 3,2%). Tes fragilitas osmotik tabung tunggal ditemukan positif pada 12 dari 17 penderita talasemia beta carrier, 8 subjek positif pada bukan talasemia beta carrier. Diantara 8 tes fragilitas osmotik tabung tunggal positif tetapi bukan penderita talasemia carrier, 7 subjek mempunyai indeks Mentzer \geq 13 yang dicurigai adalah penderita defisiensi besi. Satu subjek tes fragilitas osmotik tabung tunggal positif dan indeks Mentzer <13, berkemungkinan adalah penderita talasemia a minor atau hemoglobinopati lainnya.

Pada penelitian ini 3 subjek penelitian mempunyai kadar HbA2 antara 35,20–38,5%. Sesuai karakteristik analisis hemoglobin menggunakan HPLC, kadar HbA2 yang >10% merupakan HbE atau HbA2 + HbE. Hal ini merupakan kelemahan alat HPLC yang tidak bisa membedakan HbA2 dan HbE dengan baik karena kedua hemoglobin tersebut

mempunya pI yang sama sehingga mengalami ko elusi dengan resin. Analisis hemoglobin pada pasien ini sebaiknya dilakukan menggunakan metoda *capillary zone electrophoresis* agar dapat ditentukan masing masing kadar HbA2 dan HbF.

KESIMPULAN

Sensitivitas, spesifisitas, nilai prediksi positif dan nilai prediksi negatif panel 1 (MCV dan indeks Mentzer) untuk skrining talasemia minor secara berurutan adalah 11,8%, 90%, 66,7% dan 37,5%. Sensitivitas, spesifisitas, nilai prediksi positif dan nilai prediksi negatif panel 2 (MCV dan fragilitas osmotik tabung tunggal) untuk skrining talasemia minor secara berurutan adalah 70,6%, 20%, 60% dan 28,6%. Sensitivitas, spesifisitas, nilai prediksi positif dan nilai prediksi negatif panel 3 (indeks Mentzer dan fragilitas osmotik tabung tunggal) untuk skrining talasemia minor secara berurutan adalah 11,8%, 90%, 66,7% dan 37,5%.

DAFTAR PUSTAKA

1. Weatherall DJ, Clegg JB. The thalassaemia syndromes. Oxford, Blackwell Science. 2001. <https://doi.org/10.1002/9780470696705>
2. Weatherall DJ, Clegg JB. Inherited haemoglobin disorders: an increasing global health problem. Bulletin of the World Health Organization. 2001;79(8).
3. Fucharoen S, Winichagoon. Haemoglobinopathies in Southeast Asia. Indian J Med Res. 2011; 134(4): 498–506.
4. RRI.co.id. Catatan Kemenkes Menyebutkan Angka Penderita Talasemia Masih Tinggi.2019. Diakses dari http://rri.co.id/post/berita/674133/kesehatan/catatan_kemenkes_menyebutkan_angka_penderita_talasemia_masih_tinggi.html
5. Bajwa H, Basit H. Thalassemia. [Updated 2019 Aug 20]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2019.
6. Northern California Comprehensive Thalassaemia Centre. The inheritance of thalassaemia. Diakses dari <https://thalassaemia.com/genetics-inheritance.aspx#gsc.tab=0>

7. Ghosh K, Colah R, Manglani M, Choudhry VP, Verma I, Madan N, et al. Guidelines for screening, diagnosis and management of hemoglobinopathies. *Indian J Hum Genet.* 2014; 20(2):101-19.
8. Brancaleoni V, Di Piero E, Motta I, Capellini. Laboratory diagnosis of thalassemia. 016 John Wiley & Sons Ltd, Int. Jnl. Lab. Hem. 2016; 38(1): 32–40.
9. Young KL, Hee-Jin K, Kyunghoon L, Sang Hyuk P, Sang Hoon S, Moon WS et al. Recent progress in laboratory diagnosis of thalassemia and hemoglobinopathy: a study by the Korean red blood cell disorder working party of the Korean Society of Hematology. *Blood Res.* 2019; 54:17-22.
10. Giambona A, Passarello C, Renda D, Maggio A. The significance of the hemoglobin A(2) value in screening for hemoglobinopathies. *Clin Biochem.* 2009; 42(18):1786-96.
11. Arora S, Kolte S, Rana D, Dawson L. Validation of new indices for differentiation between iron deficiency anemia and beta thalassemia trait, a study in pregnant females. *International Journal of Scientific Report.* 2018; 4(2): 26.
12. Vehapoglu A, Ozgurhan A, Demir AD, Uzuner S, Nursoy MA, Turkmen S, Kacan A. Hematological indices for differential diagnosis of beta thalassemia trait and iron deficiency anemia. Hindawi Publishing Corporation. 2014; Article ID 576738, 7 pages <http://dx.doi.org/10.1155/2014/576738>
13. Ghafouri M, Sharifi L, Sefat LM. Comparison of cell counter indices in differentiation of beta thalassemia trait and iron deficiency anemia. Diakses dari https://www.researchgate.net/publication/309476203_Comparison_of_cell_counter_indices_in_differentiation_of_beta_thalassemia_trait_and_iron_deficiency_anemia
14. Macioni L, Cao A. Osmotik fragility test in heterozygotes for and thalassaemia. *Journal of Medical Genetics.* 1985; 22; 374-6.
15. Bujang MA, Adnan TH. Requirements for minimum sample size for sensitivity and specificity analysis. *Journal of Clinical and Diagnostic Research.* 2016; 10(10): 01-06.
16. Thorner, RM, Remein QR. Principles and procedures in the evaluation of screening for Disease Diakses dari <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/196627005641>
17. Husna N, Sanka I, Arif AA, Putri C, Leonard E, Satuti N, Handayani N. Prevalence and distribution of thalassemia trait screening. *Journal of The Medical Sciences.* 2017; 49(3).106-13.
18. Nuryanti, Ganie RA, Aman AK. β -Thalassemia trait menggunakan elektroforesis mikrokapiler. *Indonesian Journal of Clinical Pathology and Medical Laboratory.* 2015; 21(2).
19. Madan N, Beachler L, Konstantinopoulos P, Worley S, Sun Z, Latson LA. Red cell indices and discriminant functions in the detection of beta- thalassaemia trait in a population with high prevalence of iron deficiency anaemia. *Pediatr Cardiol* 2010; 31: 1203-8.
20. Sirichotiyakul S, Sa-nguansermstri T, Maneerat J, Dhananjayanonda P. Sensitivity and specificity of mean corpuscular volume testing for screening for α -thalassemia-1 and β -thalassemia traits. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Research.* 2005; 31(3):198-201.
21. Bose S, Maimoon S. Is Mentzer Index a reliable diagnostic screening tool for beta thalassemia trait? *Journal of Dental and Medical Sciences (IOSR-JDMS).* 2018; 17(7): 07-11.
22. Rathod DA, Kaur A, Patel V, Patel K, MD, Kabrawala R, Patel V, Patel M, Shah P. Usefulness of cell counter-based parameters and formulas in detection of β -thalassemia trait in areas of high prevalence. *Am J Clin Pathol.* 2007; 128: 585-9.
23. Galanello R. Screening and diagnosis for hemoglobin disorder. prevention of thalassaemias and other haemoglobin disorders: Vol 1: Principles [Internet]. 2nd edition
24. Sorathiya VP, Vachhani NA, Nandani SL, Vekariya DJ, Kashiyani HN, Colah RB. Experience with NESTROFT for screening for thalassemia trait/ minor: evaluation against CBC and HPLC in a high prevalence region in Saurashtra, Gujarat, India. *International Journal of Research in Medical Sciences.* Int J Res Med Sci. 2020; 8(3):1108-13.

25. Kattamis C, Efremov G, Pootrakul S. Effectiveness of one tube osmotik fragility screening in detecting beta-thalassaemia trait. *J Med Gene*. 1981; 18(4): 266-70.
26. Hana WP, Huang L, Lia YY, Hana YY, Lia D, Ana BQ et al. Reference intervals for HbA2 and HbF and cut-off value of HbA2 for β thalassemia carrier screening in a Guizhou population of reproductive age. *Clinical Biochemistry*. 2019; 65: 24-28.