

**PERFORMA DIAGNOSTIK *SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISM*
(SNP) rs9399137 DAN rs72872548 DENGAN EKSPRESI
PHOSPHATIDYLSERINE PADA SEL DARAH MERAH (*PS-EXPOSED
RBCS*) SEBAGAI MODEL PREDIKTOR TINGKAT KEPARAHAN
BETA-THALASSEMIA**

DISERTASI

Oleh

**PUTU RISTYANING AYU SANGGING
NPM 2337061007**



**PROGRAM DOKTOR PASCASARJANA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS LAMPUNG
2026**

**PERFORMA DIAGNOSTIK *SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISM*
(SNP) rs9399137 DAN rs72872548 DENGAN EKSPRESI
PHOSPHATIDYLSERINE PADA SEL DARAH MERAH (*PS-EXPOSED*
RBCS) SEBAGAI MODEL PREDIKTOR TINGKAT KEPARAHAN
BETA-THALASSEMIA**

Oleh

PUTU RISTYANING AYU SANGGING

Disertasi

**Sebagai Salah Satu Syarat Untuk Mencapai Gelar
DOKTOR**

Pada

**Program Studi Doktor MIPA
Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung**



**PROGRAM DOKTOR PASCASARJANA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS LAMPUNG
2026**

Judul Disertasi : **PERFORMA DIAGNOSTIK *SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISM* (SNP) rs9399137 DAN rs72872548 DENGAN EKSPRESI *PHOSPHATIDYL SERINE* PADA SEL DARAH MERAH (*PS-EXPOSED RBCS*) SEBAGAI MODEL PREDIKTOR TINGKAT KEPARAHAN BETA-THALASSEMIA**

Nama Mahasiswa : *Putu Ristyning Ayu Sangging*
NPM : 2337061007
Program Studi : **Doktor MIPA**
Fakultas : **Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam**
Bidang Minat : **Hematologi**



Ko-Promotor 1

Ko-Promotor 2

[Signature]
Prof. Dr. Sutyarso, M. Biomed
NIP. 195901011987031001

[Signature]
Dr. dr. Khairun Nisa, M. Kes., AIFO
NIP. 197402262001122002

2. Koordinator Program Studi Doktor MIPA

Universitas Lampung

[Signature]

Dr. Khoirin Nisa, M. Si
NIP. 19740726000032001

MENGESAHKAN

1. Tim Penguji

Tanda Tangan

Ketua : **Dr. Eng. Heri Satria, S.Si., M. Si**
NIP. 197110012005011002

Sekretaris : **Dr. Khoirin Nisa, S.Si., M. Si**
NIP. 197407262000032001


Anggota : **Prof. Dr. Hendri Busman, M. Biomed**
NIP. 195901011987031001

: **Prof. Dr. Sutyarso, M. Biomed**
NIP. 195704241987031001


: **Dr. dr. Khairun Nisa, M. Kes., AIFO**
NIP. 197402262001122002


: **Dr. dr. Evi Kurniawaty, M. Sc**
NIP. 197601202003122001


: **Dr. dr. Hidayat, M. Kes., Sp.PK., Subsp.P.I(K)**
NIP. 197210082002121003


.....



.....


.....


.....


.....


.....


.....

2. Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam,



Dr. Eng. Heri Satria, S.Si., M. Si
NIP. 197110012005011002

Tanggal Lulus Ujian Disertasi : 4 Juni 2026

RIWAYAT HIDUP

Penulis dilahirkan di Denpasar, pada tanggal 22 Februari 1976 dari pasangan Ir. Ketut Wijana Sangging, S.H. (Alm) dan Ibu Dra. Ni Ketut Suari.

Penulis menyelesaikan pendidikan sekolah dasar di SDN 25 Dangin Puri Denpasar Timur pada tahun 1987. Penulis kemudian melanjutkan pendidikan ke SMP Saraswati 1 (SLUB 1) Denpasar dan lulus pada tahun 1990. Pada tahun yang sama, penulis melanjutkan pendidikan ke SMA Perintis Denpasar dan menyelesaikan pendidikannya pada tahun 1993. Penulis selanjutnya melanjutkan pendidikan pada Fakultas Kedokteran Universitas Hang Tuah, Surabaya dan lulus pada tahun 2002. Pada tahun 2008, penulis melanjutkan pendidikan pada Program Studi Pendidikan Dokter Spesialis Patologi Klinik di Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin, Makassar dan mendapatkan gelar Spesialis Patologi Klinik pada tahun 2012. Pada tahun yang sama, penulis juga mendapatkan gelar Magister Kesehatan dari universitas yang sama, yaitu Universitas Hasanuddin, Makassar. Pada tahun 2021, penulis menyelesaikan pendidikan Sp2 di Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro pada Program Studi Patologi Klinik dengan Kepeminatan Hematologi. Pada tahun 2023, penulis melanjutkan pendidikan ke jenjang doktoral di Program Studi Doktor MIPA Universitas Lampung.

Penulis merupakan dosen pada Fakultas Kedokteran Universitas Lampung sejak tahun 2012 sampai sekarang pada Bagian Patologi Klinik. Selain itu, penulis juga berprofesi sebagai Dokter Spesialis Patologi Klinik sejak tahun 2012 sampai sekarang.

LEMBAR PERSEMBAHAN

Dengan penuh rasa syukur kepada Tuhan Yang Maha Esa atas segala karunia nya,
karya ini saya persembahkan kepada:

“ Kedua orang tuaku, Bapak Ir. Ketut Wijana Sangging, S.H. (Alm) dan Ibunda Dra. Ni Ketut Suari. Suami ku terkasih, dr. I Nyoman Okayasa, Sp. OG dan anak ku tersayang, Putu Karis Ayu Kirana, S. Ked. Kedua adik ku tersayang, Made Rissani Ayu Sangging, S.E., dan Nyoman Risman Darma Sangging, S.E. Bapak dan Ibu mertua terkasih., Serta para dosen, pembimbing, dan seluruh pihak yang telah membimbing, mendidik, serta memberikan ilmu dan pengalaman yang berharga selama perjalanan Pendidikan ini”

LEMBAR PERNYATAAN

Dengan ini saya menyatakan dengan sebenarnya, bahwa:

1. Disertasi dengan judul **“IDENTIFIKASI SPESIFISITAS DAN SENSITIVITAS PEMERIKSAAN KOMBINASI *SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISM* (SNP) rs9399137 DAN rs72872548 DENGAN PAPARAN *PHOSPHATIDYLSERINE* PADA SEL DARAH MERAH (*PS-EXPOSED RBCS*) SEBAGAI MODEL PREDIKTOR TINGKAT KEPARAHAN BETA-THALASSEMIA”** adalah karya saya sendiri dan tidak melakukan penjiplakan atau pengutipan atas karya lain dengan cara yang tidak sesuai dengan tata etika ilmiah yang berlaku dalam masyarakat akademik atau yang disebut plagiarisme.
2. Hak intelektual atas karya ilmiah ini, diserahkan sepenuhnya kepada Universitas Lampung.

Atas pernyataan ini, apabila dikemudian hari ternyata ditemukan adanya ketidakbenaran, saya bersedia menanggung akibat dan sanksi yang diberikan kepada saya.

Bandar Lampung, 07 Mei 2026

Pembuat Pernyataan



Putu Ristyning Ayu Sangging

UCAPAN TERIMA KASIH

Rangkaian Puja dan Puji syukur penulis haturkan kepada Tuhan Yang Maha Kuasa, yang telah menciptakan segala sesuatu dengan kuasanya. Berkat bimbingan dan kasih dan sayangNya, penulis dapat menyelesaikan disertasi ini.

Beta-thalassemia merupakan penyakit hereditas yang ditandai oleh penurunan atau tidak adanya sintesis rantai polipeptida globin, sehingga produksi Hb menjadi tidak adekuat dan menyebabkan anemia kronis, serta berbagai komplikasi klinis lainnya. Di Indonesia, penyakit ini memiliki prevalensi yang cukup tinggi. Perkembangan penelitian terkini, menunjukkan bahwa variasi genetik berbasis *Single Nucleotide Polymorphism* (SNP) dan peningkatan *Phosphatidylserine-Exposed Red Blood Cells* (*PS-Exposed RBCs*), berperan dalam memengaruhi manifestasi klinis dan tingkat keparahan penyakit. Penelitian mengenai potensi penggunaan kedua faktor tersebut sebagai prediktor keparahan pada populasi Indonesia masih sangat kurang. Penelitian ini diharapkan menjadi temuan awal dalam merintis pengembangan prediktor keparahan beta-thalassemia berbasis genetik dan marker biokimia di Indonesia.

Penulis mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada:

1. Pimpinan Universitas Lampung, Ibu Rektor, Prof. Dr. Ir. Lusmeilia Afriani, D.E.A., IPM., ASEAN Eng. beserta jajaran.
2. Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung, Bapak Dr. Eng. Heri Satria, S.Si., M. Si., beserta jajaran.
3. Direktur Program Pasca Sarjana Universitas Lampung, Bapak Prof. Dr. Ir. Murhadi, M. Si., beserta jajaran.
4. Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Lampung, Ibu Dr. dr. Evi Kurniawaty, M. Sc., beserta jajaran.
5. Ketua Program Studi Doktor MIPA Universitas Lampung, Dr. Khoirin Nisa, S.Si., M. Si., Sekretaris Program Studi Doktor MIPA Universitas Lampung beserta Staf Akademik. Terima kasih atas bimbingan, koreksi, dan ilmu

pengetahuan yang telah dicurahkan kepada penulis sejak awal perkuliahan hingga saat ini.

6. Bapak Prof. Dr. Hendri Busman, M. Biomed, selaku ketua komisi pembimbing, promotor, dosen pembimbing akademik dan mentor. Penulis mengucapkan banyak terima kasih atas bimbingan, nasihat, arahan, motivasi dan teladan yang telah diberikan kepada penulis dari awal studi sampai penyelesaian studi di Program Studi Doktor MIPA Universitas Lampung.
7. Bapak Prof. Dr. Sutyarso, M. Biomed, selaku pembimbing disertasi dan kopromotor. Penulis mengucapkan banyak terima kasih atas bimbingan, nasihat, arahan, motivasi dan teladan yang telah diberikan kepada penulis dari awal studi sampai penyelesaian studi di Program Studi Doktor MIPA Universitas Lampung.
8. Ibu Dr. dr. Khairun Nisa, M. Kes., AIFO, selaku pembimbing disertasi, kopromotor, senior dan rekan kerja. Terima kasih atas bimbingan, motivasi, nasihat dan arahan yang sudah diberikan kepada penulis selama penyusunan disertasi ini.
9. Ibu Dr. dr. Evi Kurniawaty, M. Sc selaku penguji, senior dan rekan kerja. Terima kasih atas bimbingan, motivasi, nasihat dan koreksi yang sudah diberikan kepada penulis selama penyusunan disertasi ini.
10. Bapak Dr. dr. Hidayat, M.Kes., Sp.PK., Subsp.P.I(K) selaku penguji dan rekan kerja. Terima kasih atas bimbingan, koreksi, dan ilmu pengetahuan yang telah dibagikan kepada penulis selama penyusunan disertasi ini.
11. Bapak Dr. Wawan Abdullah Setiawan, M. Si. Terima kasih atas bantuan dan kerjasamanya yang sangat baik selama pelaksanaan penelitian yang sudah dilakukan untuk penyelesaian disertasi ini.
12. Teman-teman dosen di Universitas Lampung.
13. Teman-teman mahasiswa Program Studi Doktor MIPA angkatan 2023.
14. Kedua orang tua tercinta, Bapak Ir. Ketut Wijana Sangging, S.H. (Alm) dan Ibu Dra. Ni Ketut Suari, adik-adik saya tersayang Made Rissani Ayu Sangging, S.E. dan Nyoman Risman Darma Sangging, S.E. Terima kasih atas kasih sayang, doa dan harapan yang selalu diberikan kepada penulis. Bapak dan Ibu mertua tercinta, terima kasih atas kasih sayang dan perhatian yang

telah diberikan.

15. Suamiku tercinta, dr. I Nyoman Okayasa, Sp. OG dan anakku tersayang, Putu Karis Ayu Kirana, S. Ked. Terima kasih atas kasih sayang, doa, perhatian, semangat, motivasi dan segala pengorbanan yang sudah diberikan kepada penulis.
16. Pihak-pihak lain yang tidak dapat penulis sebutkan satu persatu.

Semoga Tuhan Yang Maha Kuasa membalas semua kebaikan Bapak, Ibu dan Saudara dengan balasan yang lebih baik. Amin.

Bandar Lampung, 04 Juni 2026

Putu Ristyning Ayu Sangging

ABSTRAK

PERFORMA DIAGNOSTIK *SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISM* (SNP) rs9399137 DAN rs72872548 DENGAN EKSPRESI *PHOSPHATIDYLSERINE* PADA SEL DARAH MERAH (*PS-EXPOSED RBCS*) SEBAGAI MODEL PREDIKTOR TINGKAT KEPARAHAN BETA-THALASSEMIA

Oleh

PUTU RISTYANING AYU SANGGING

Mutasi gen beta globin merupakan penyebab utama beta-thalassemia, yaitu suatu penyakit hereditas yang ditandai oleh penurunan atau tidak adanya sintesis rantai polipeptida globin, sehingga produksi Hb menjadi tidak adekuat. Pada pasien beta-thalassemia, peroksidasi lipid membran eritrosit pasca transfusi, dapat meningkatkan ekspresi *phosphatidylserine* pada sel darah merah (*PS-Exposed RBCs*), yang berperan dalam aktivasi faktor koagulasi V dan X, sehingga memicu trombotik. Beberapa *Single Nucleotide Polymorphism* (SNP) diketahui berhubungan dengan dengan gen pengekspresi penyakit ini, diantaranya rs9399137 pada region HBS1L-MYB dan rs72872548 pada gen HbE. Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi spesifisitas dan sensitivitas kombinasi SNP rs9399137, rs72872548 dengan *PS-Exposed RBCs* dalam memprediksi tingkat keparahan pasien beta-thalassemia. Penelitian ini merupakan studi observasi laboratorik, yang melibatkan 32 orang pasien beta-thalassemia. Pemeriksaan SNP rs9399137 dan rs72872548 dilakukan menggunakan metode PCR dan sekuensing DNA, sedangkan ekspresi *PS-Exposed RBCs* menggunakan metode ELISA. Hasil penelitian menunjukkan bahwa genotipe TT merupakan genotipe yang paling banyak ditemukan pada SNP rs9399137 (66,7%), sedangkan genotipe CC paling dominan pada SNP rs72872548 (82,1%). Penggunaan masing-masing marker SNP rs9399137, SNP rs72872548, dan *PS-Exposed RBCs* sebagai prediktor tunggal tingkat keparahan memiliki sensitivitas dan spesifisitas yang tidak cukup baik. SNP rs9399137 memiliki sensitivitas 92,30% dan spesifisitas 57,14%, SNP rs72872548 sensitivitas 92,86% dan spesifisitas 28,57% dan PS memiliki sensitivitas sebesar 64,71% dan spesifisitas 86,67%. Model kombinasi gabungan SNP rs9399137, SNP rs72872548 dan *PS-Exposed RBCs* sebagai model prediktor tingkat keparahan, memiliki sensitivitas (84,6%) dan spesifisitas (71,4%) yang paling optimal dengan nilai diskriminasi yang baik (AUC=0,852; 95% CI: 0,701–0,974). **Simpulan:** Model pemeriksaan kombinasi SNP rs9399137, SNP rs72872548 dan ekspresi PS merupakan model prediktor tingkat keparahan beta-thalassemia terbaik dengan sensitivitas dan spesifisitas yang optimal, dibandingkan parameter tunggal.

Kata kunci: Beta-thalassemia, *PS-Exposed RBCs*, *Single Nucleotide Polymorphism* (SNP), SNP rs9399137, SNP rs72872548

ABSTRACT

DIAGNOSTIC PERFORMANCE OF SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISM (SNP) rs9399137 AND rs72872548 WITH PHOSPHATIDYLSERINE EXPRESSION IN RED BLOOD CELLS (PS- EXPOSED RBCS) AS A PREDICTOR MODEL FOR BETA- THALASSEMIA SEVERITY

By

PUTU RISTYANING AYU SANGGING

Mutations in the beta-globin gene are the primary cause of beta-thalassemia, a hereditary disorder characterized by reduced or absent synthesis of globin polypeptide chains, resulting in inadequate hemoglobin (Hb) production. In patients with beta-thalassemia, post-transfusion erythrocyte membrane lipid peroxidation can increase the exposure of phosphatidylserine on red blood cells (PS-exposed RBCs), which plays a role in the activation of coagulation factors V and X, thereby triggering thrombosis. Several single nucleotide polymorphisms (SNPs) have been reported to be associated with the expression of this disease, including rs9399137 located in the HBS1L-MYB region and rs72872548 in the HbE gene. This study aimed to identify the sensitivity and specificity of a combination of SNP rs9399137, SNP rs72872548, and PS-exposed RBCs in predicting the severity of beta-thalassemia. This study was a laboratory-based observational study involving 32 patients with beta-thalassemia. Genotyping of SNP rs9399137 and rs72872548 was performed using PCR and DNA sequencing, while PS-exposed RBC levels were measured using an ELISA-based method. The results showed that the TT genotype was the most frequently observed genotype for SNP rs9399137 (66.7%), whereas the CC genotype was the most dominant for SNP rs72872548 (82.1%). The use of SNP markers rs9399137, SNP rs72872548, and PS-Exposed RBCs as single predictors of severity had insufficient sensitivity and specificity. SNP rs9399137 had a sensitivity of 92.30% and a specificity of 57.14%, SNP rs72872548 a sensitivity of 92.86% and a specificity of 28.57%, and PS had a sensitivity of 64.71% and a specificity of 86.67%. The combined model of SNP rs9399137, SNP rs72872548 and PS-Exposed RBCs as a severity predictor model, has the most optimal sensitivity (84.6%) and specificity (71.4%) with good discrimination value (AUC=0.852; 95% CI: 0.701–0.974). **Conclusion:** The combined examination model of SNP rs9399137, SNP rs72872548 and PS expression is the best beta-thalassemia severity predictor model with optimal sensitivity and specificity, compared to single parameters.

Keyword: Beta-thalassemia, PS-Exposed RBCs, Single Nucleotide Polymorphism (SNP), SNP rs9399137, SNP rs72872548

DAFTAR ISI

COVER DEPAN	i
COVER DALAM	ii
LEMBAR PENGESAHAN	iii
PENGESAHAN PENGUJI	iv
RIWAYAT HIDUP	v
LEMBAR PERSEMBAHAN	vi
LEMBAR PERNYATAAN	vii
UCAPAN TERIMA KASIH	viii
ABSTRAK	xi
ABSTRACT	xii
DAFTAR ISI	xiii
DAFTAR TABEL	xvi
DAFTAR GAMBAR	xviii
DAFTAR SINGKATAN	xix
I. PENDAHULUAN	
A. Latar Belakang Masalah	1
B. Rumusan Masalah	5
C. Tujuan Penelitian	5
D. Manfaat Penelitian	6
E. Kebaruan Penelitian	6
F. Kerangka Konseptual Penelitian	8
G. Hipotesis	9
II. TINJAUAN PUSTAKA	
A. Beta-Thalassemia	11
1. Patofisiologi Thalassemia	11
2. Hemoglobin Thalassemia	15
3. Pemeriksaan Laboratorium Diagnosa Thalassemia	16
B. Beta-Thalassemia di Indonesia	27
C. Pengaruh Suku dalam Keparahan Penyakit	28
III. METODE PENELITIAN	
A. Jenis dan Rancangan Penelitian	30
B. Waktu dan Tempat Penelitian	30
C. Populasi dan Sampel	31
D. Persetujuan Etik	31
E. Klasifikasi Variabel dan Definisi Operasional	31

1.	Variabel Bebas dan Variabel Terikat	31
2.	Definisi Operasional Penelitian	32
F.	Alat dan Bahan Penelitian	33
1.	Alat Penelitian	33
2.	Bahan Penelitian	33
G.	Prosedur Penelitian	33
1.	Pemeriksaan Ekspresi PS menggunakan metode ELISA	33
2.	Pemeriksaan Polimorfisme Nukleotida Tunggal (SNP)	34
H.	Analisa Data	37
1.	Analisa Data Hasil Sekuensing	37
2.	Analisa Data Hasil Penelitian	38
I.	Alur Penelitian	40

IV. HASIL DAN PEMBAHASAN

A.	Hasil Penelitian	41
1.	Karakteristik Sampel	41
2.	Variasi SNP rs9399137 pada Pasien Beta-Thalassemia	42
3.	Variasi SNP rs72872548 pada Pasien Beta-Thalassemia	43
4.	Sensitivitas dan Spesifisitas Variasi SNP rs9399137 Sebagai Prediktor Tingkat Keparahan Pasien Beta-Thalassemia	46
5.	Sensitivitas dan Spesifisitas Variasi Genotipe SNP rs72872548 Sebagai Prediktor Tingkat Keparahan Pasien Beta-Thalassemia	49
6.	Sensitivitas dan Spesifisitas Ekspresi <i>Phosphatidylserine</i> Pada Sel Darah Merah (<i>PS-Exposed Rbcs</i>) Sebagai Prediktor Tingkat Keparahan Pasien Beta-Thalassemia	52
7.	Sensitivitas dan Spesifisitas Model Kombinasi SNP rs9399137, SNP rs72872548 dan Ekspresi <i>Phosphatidylserine</i> pada Sel Darah Merah (<i>PS-Exposed RBCs</i>) Sebagai Prediktor Tingkat Keparahan Pasien Beta-Thalassemia	54
8.	Perbandingan Sensitivitas dan Spesifisitas Antara Model Prediktor Tunggal dan Model Kombinasi SNP rs9399137, SNP rs72872548 dan Ekspresi PS dalam Menentukan Tingkat Keparahan Pasien Beta-Thalassemia	57

B.	Pembahasan	59
1.	Karakteristik Sampel Penelitian	59
2.	Genotipe TT Merupakan Varian Genotip Mayoritas Pada SNP rs9399137 dan Berhubungan Secara Signifikan dengan Tingkat Keparahan Pasien Beta-Thalassemia	69
3.	Genotipe CC Merupakan Varian Genotip Mayoritas Pada SNP Rs72872548 dan Tidak Berhubungan Secara Signifikan dengan Tingkat Keparahan Pasien Beta-Thalassemia	75
4.	Variasi Genotipe SNP rs9399137 memiliki sensitivitas yang tinggi namun dengan spesifisitas yang rendah dalam memprediksi tingkat keparahan pasien beta-thalassemia	80
5.	Variasi Genotipe SNP rs72672548 memiliki sensitivitas yang tinggi namun dengan spesifisitas yang rendah dalam memprediksi tingkat keparahan pasien beta-thalassemia	81
6.	Kadar PS memiliki spesifisitas yang baik namun dengan sensitivitas yang rendah dalam memprediksi tingkat keparahan pasien beta-thalassemia	83
7.	Kombinasi Antara SNP rs9399137, SNP rs72872548 dan Ekspresi PS Menghasilkan Sensitivitas dan Spesifisitas Tertinggi dalam Memprediksi Tingkat Keparahan Pasien Beta-Thalassemia	87
V.	KESIMPULAN DAN SARAN	
A.	Kesimpulan	92
B.	Saran	93
	DAFTAR PUSTAKA	94
	LAMPIRAN	128

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Manisfestasi Klinis	27
2. Definisi Operasional	32
3. Karakteristik Subyek Penelitian	41
4. Distribusi Genotipe dan Frekuensi Alel SNP rs9399137	44
5. Distribusi Genotipe dan Frekuensi Alel SNP rs72872548	46
6. Hubungan Variasi Genotipe SNP rs9399137 dengan Prediktor Tingkat Keparahan Beta-Thalassemia.....	47
7. Sensitivitas dan Spesifisitas Variasi Genotipe SNP rs9399137 sebagai Prediktor Tingkat Keparahan Beta-Thalassemia.....	47
8. Tingkat Keparahan Beta-thalassemia Berdasarkan Variasi Genetik SNP rs9399137.....	48
9. Perbedaan Kadar Hb, Ht dan Indeks Eritrosit Antara Genotipe TT dan Non TT.....	49
10. Hubungan Variasi Genotipe SNP rs72872548 dengan Prediktor Tingkat Keparahan Beta-Thalassemia.....	50
11. Sensitivitas dan Spesifisitas Variasi Genotipe SNP rs72872548 sebagai Prediktor Tingkat Keparahan Beta-Thalassemia.....	50
12. Perbedaan kadar Hb, Ht dan Indeks Eritrosit Antara Genotipe CC dan Non CC	51
13. Perbandingan Ekspresi <i>Phosphatidylserine</i> dengan Tingkat Keparahan Penyakit Beta-thalassemia	52
14. Sensitivitas dan Spesifisitas Ekspresi PS sebagai Prediktor Tingkat Keparahan Beta-Thalassemia	54
15. Korelasi Ekspresi PS Dengan Parameter Hematologi.....	54
16. Performa Diagnostik Model Kombinasi Ekspresi PS, SNP rs9399137 dan SNP rs72872548 Terhadap Tingkat Keparahan Beta Thalassemia	56

17. Analisis Regresi Logistik Kombinasi Ekspresi PS, SNP rs9399137 dan SNP rs72872548 Terhadap Tingkat Keparahan Beta-Thalassemia	56
18. Perbandingan Performa Diagnostik Model Prediktor Tunggal dan Model Kombinasi SNP rs9399137, SNP rs72872548 dan Ekspresi PS Terhadap Tingkat Keparahan Beta-Thalassemia	58

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Kerangka Konseptual Penelitian.....	8
2. Patofisiologi Beta-Thalassemia	12
3. Skema Eritropoiesis	13
4. Struktur Klaster Gen α dan β	14
5. Perubahan Gen Globin Thalassemia.....	16
6. Apusan Darah Tepi Beta-Thalassemia/ HbE Heterozigot.....	18
7. Gambaran Analisis Hb Metode HPLC	20
8. Lokasi SNP rs9399137 pada Kromosom 6 Region 6q23.2	23
9. Lokasi SNP rs72872548 pada Kromosom 11(p15.4).....	23
10. Alur Diagnosis Thalassemia	26
11. Alur Kerja Pemeriksaan SNP	36
12. Alur Penelitian.....	38
13. Hasil Elektroforesis SNP rs9399137	43
14. Hasil Elektroforesis SNP rs728722548.....	45
15. Kurva ROC Ekspresi PS Terhadap Tingkat Keparahan Pasien Beta-Thalassemia	53
16. Kurva ROC pada Berbagai Model Kombinasi Terhadap Tingkat Keparahan Beta-Thalassemia	57

DAFTAR SINGKATAN

ACRS	: <i>Artificially-Created Restriction Site</i>
AHSP	: <i>Alpha Hemoglobine Stabilizer Protein</i>
ARMS	: <i>Amplification Refractory Mutation System</i>
AUC	: <i>Area Under the Curve</i>
BCL11A	: <i>B-Cell Lymphoma/ Leukemia 11A</i>
BFU-E	: <i>Burst Forming Unit-Erythroid</i>
CBC	: <i>Complete Blood Count</i>
CDC	: <i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
CE	: <i>Cappillary Electrophoresis</i>
CI	: <i>Confidence Interval</i>
dNTPs	: <i>deoksiribonukleotida</i>
ddNTPs	: <i>dideoksiribonukleotida</i>
DNA	: <i>Deoxyribo Nucleic Acid</i>
DPL	: <i>Diagnostik Peritoneal Lavage</i>
dTP	: <i>deoxy Threo Pentulose</i>
EDTA	: <i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>
EPO	: <i>Erithropoetin</i>
FasL	: <i>Fas Ligand</i>
FK	: <i>Fakultas Kedokteran</i>
FL	: <i>Fluoresent Light</i>
FMIPA	: <i>Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam</i>
FSC	: <i>Forward Scatter</i>
GDF 11	: <i>Growth Differentiation Factor 11</i>
GWAS	: <i>Genome-Wide Association Studies</i>
Hb	: <i>Hemoglobin</i>
Hb A	: <i>Hemoglobin Adult</i>
Hb A2	: <i>Hemoglobin Adult 2</i>
Hb E	: <i>Hemoglobin E</i>
Hb F	: <i>Hemoglobin Fetal</i>
HBG2	: <i>Hemoglobin Subunit Gamma 2</i>
HBS1L	: <i>HBS1-like translational GTPase</i>
HPFH	: <i>Hereditary Persistence of Fetal Hemoglobin</i>
HPLC	: <i>High Performance Liquid Chromatography</i>
KLF1	: <i>Kruppel-Like Factor 1</i>
LPI	: <i>Labile Plasma Iron</i>
LR	: <i>Likelihood Ratio</i>
Ht	: <i>Hematokrit</i>
Max	: <i>Maximal</i>
MCH	: <i>Mean Corpuscular Hemoglobin</i>
MCV	: <i>Mean Corpuscular Volume</i>
MCHC	: <i>Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration</i>
Min	: <i>Minimal</i>
mRNA	: <i>messenger Ribonucleic Acid</i>
MYB	: <i>Myeloblastosis</i>

NGS	: <i>Next Generation Sequencing</i>
NPV	: <i>Negative Predictive Value</i>
NTBI	: <i>NonTransferrin Bound Iron</i>
NTDT	: <i>NonTransfusion Dependent Thalassemia</i>
OR	: <i>Odds Ratio</i>
PCR	: <i>Polymerase Chain Reaction</i>
PPV	: <i>Positive Predictive Value</i>
PS	: <i>Phosphatidylserine</i>
RBC	: <i>Red Blood Cell</i>
RDW	: <i>Red Cell Distribution Widht</i>
RFLP	: <i>Restriction fragment length polymorphism</i>
RNA	: <i>Ribonucleic Acid</i>
ROC	: <i>Receiver Operating Characteristic</i>
RSCM	: <i>Rumah Sakit Cipto Mangunkusumo</i>
SD	: <i>Standar Deviasi</i>
SNPs	: <i>Single Nucleotide Polymorphisms</i>
SSC	: <i>Side Scatter</i>
TDT	: <i>Transfusion Dependent Thalassemia</i>
TGF- β	: <i>Transforming Growth Factor Beta</i>
TNF- α	: <i>Tumor Necrosis Factor α</i>
WHO	: <i>World Health Organization</i>

I. PENDAHULUAN

A. Latar Belakang Masalah

Thalassemia merupakan salah satu kelainan genetik yang diturunkan dari orang tua kepada anak dan paling sering ditemukan di seluruh dunia. *World Health Organization* (WHO) memperkirakan bahwa sekitar 7% populasi dunia merupakan pembawa sifat thalassemia. Distribusi tertinggi dari penyakit ini dapat ditemukan pada wilayah yang dikenal sebagai *thalassemia belt*/sabuk thalassemia yang meliputi kawasan mediterania, Timur Tengah, Asia Selatan, Semenanjung China, Asia Tenggara, hingga kepulauan Pasifik (Brancaleoni *et al.*, 2016; Munkongdee *et al.*, 2020). Seiring dengan meningkatnya mobilitas penduduk dan terjadinya perkawinan antar etnis, penyakit ini telah menyebar melintasi wilayah endemik nya ke seluruh dunia, termasuk ke wilayah-wilayah yang sebelumnya dikenal memiliki prevalensi yang rendah, seperti Eropa Utara (Hastuti *et al.*, 2023; Cao & Galanello, 2010). Kondisi ini menegaskan bahwa thalassemia saat ini telah menjadi tantangan bagi tatanan kesehatan global dan memerlukan perhatian serius, serta solusi yang komprehensif.

Sebagai wilayah yang termasuk ke dalam sabuk thalassemia, Indonesia juga memiliki masalah kesehatan yang cukup signifikan terkait thalassemia. Berdasarkan data epidemiologi, diperkirakan 3-10% dari populasi Indonesia memiliki gen karier thalassemia. Hal ini menempatkan Indonesia menjadi salah satu negara dengan resiko thalassemia yang tinggi. Kementerian Kesehatan sendiri mencatat ada 11.000 penderita thalassemia di Indonesia pada tahun 2023 (Farid *et al.*, 2023). Sementara itu, jika dihitung menggunakan pendekatan Hardy-Weinberg tentang frekuensi alel dari generasi ke generasi, maka setiap tahunnya diperkirakan akan ada 2.500 bayi yang lahir dengan thalassemia mayor. Hal ini, tentunya akan memberikan dampak yang signifikan pada beban pembiayaan kesehatan nasional.

Thalassemia merupakan kelainan sintesis hemoglobin (Hb) yang disebabkan oleh adanya gangguan produksi rantai globin. Normal nya, hemoglobin tersusun atas dua rantai alfa dan dua rantai beta yang harus berada dalam keseimbangan. Adanya ketidakseimbangan jumlah rantai globin ini, akan mengganggu pembentukan hemoglobin normal dan menyebabkan kerusakan sel eritrosit (Lantip, 2019). Thalassemia dapat diklasifikasikan berdasarkan genetik, klinis maupun kebutuhannya akan transfusi. Secara genetik, thalassemia dapat dibedakan menjadi alfa, beta dan hemoglobinopati. Secara klinis, thalassemia diklasifikasikan menjadi thalassemia mayor, thalassemia intermediate, thalassemia minor dan thalassemia traits. Selain itu, berdasarkan kebutuhannya penderitanya akan transfusi, thalassemia dapat diklasifikasikan menjadi *Non Transfusion Dependent Thalassemia* (NTDT) dan *Transfusion Dependent Thalassemia* (TDT) (Galanello & Origa, 2010; Musallam *et al.*, 2013).

Beta-thalassemia merupakan jenis thalassemia yang menarik untuk diteliti. Hal ini dikarenakan penderitanya, terutama tipe mayor, sering kali memiliki gejala klinis yang berat dan memerlukan perawatan medis yang intensif dalam jangka panjang, sehingga lebih sering ditemukan di pusat layanan kesehatan dan rumah sakit. Secara epidemiologi, beta thalassemia juga merupakan salah satu penyakit genetik dengan prevalensi yang signifikan, baik secara global maupun di Indonesia. Setiap tahun, diperkirakan terdapat 300.000 – 500.000 bayi baru lahir dengan kelainan hemoglobin berat dan diperkirakan terdapat 50.000 – 100.000 kematian akibat beta thalassemia mayor (Hastuti *et al.*, 2023; Cao & Galanello, 2010).

Beta-thalassemia sendiri merupakan kelainan autosomal resesif akibat adanya mutasi pada gen HbB di kromosom 11 yang berperan dalam sintesis rantai beta globin. Mutasi yang terjadi dapat berupa mutasi titik maupun delesi yang berakibat pada terganggunya sintesis rantai beta globin (Musallam *et al.*, 2013). Mutasi tersebut dapat menyebabkan gen mengalami kerusakan total (β^0) yang berakibat tidak adanya produksi rantai beta globin, maupun kerusakan parsial (β^+) yang mengakibatkan penurunan produksi rantai beta globin (Lee *et al.*, 2021). Kedua kondisi tersebut, menyebabkan adanya defisiensi rantai beta globin dan kelebihan rantai alfa yang tidak berpasangan. Hal ini pada akhirnya

akan memicu kerusakan sel eritrosit melalui proses eritropoiesis yang tidak efektif dan hemolisis. Kondisi ini berujung dengan adanya anemia kronis dengan manifestasi mikrositik hipokromik dengan gejala klinis yang beragam (Wahidiyat et al., 2020; Olivieri, 1999).

Beta-thalassemia memiliki gejala klinis yang sangat luas, dari ringan hingga berat, bergantung pada jenis mutasi genetik yang mendasarinya (Huang *et al.*, 2020). Pasien dengan thalassemia mayor umumnya mengalami anemia berat yang memerlukan transfusi rutin, sedangkan bentuk intermedia dan minor menunjukkan derajat keparahan yang lebih ringan dengan kebutuhan transfusi yang bervariasi (Lee et al., 2021; Olivieri, 1999). Selain anemia, pasien juga berisiko mengalami berbagai komplikasi seperti splenomegali, gangguan endokrin, osteoporosis, serta gangguan fungsi organ akibat kelebihan zat besi yang terakumulasi dari transfusi berulang dan peningkatan absorpsi usus (Longo et al., 2021; Rivella, 2009; Hershko & Rachmilewitz, 1979).

Pada beberapa tahun terakhir, perhatian terhadap mekanisme patofisiologi thalassemia semakin berkembang, terutama mengenai peranan stres oksidatif dan perubahan-perubahan yang terjadi pada membran sel eritrosit penderita beta thalassemia. Salah satu temuan penting dari penelitian-penelitian tersebut adalah adanya peningkatan sel eritrosit yang mengekspresikan *phosphatidylserine (PS-exposed RBCs)* (Chansai *et al.*, 2022). *Phosphatidylserin* (PS) adalah fosfolipid bermuatan negatif yang umumnya terletak pada di monolayer bagian dalam membran sel eritrosit. Pada kondisi beta thalassemia, terjadi translokasi PS ke permukaan luar membran sel eritrosit akibat adanya kerusakan oksidatif. Ekspresi PS pada permukaan sel eritrosit ini, selanjutnya akan memicu kematian sel secara prematur akibat adanya eritropoiesis yang tidak efektif maupun hemolisis (Hastuti *et al.*, 2023; Prahasanti et al., 2025). Selain itu, ekspresi PS juga berkontribusi terhadap kondisi hiperkoagulasi dan peningkatan risiko trombosis (Huang *et al.*, 2020; Puar *et al.*, 2019). Temuan-temuan ini menunjukkan bahwa *PS-exposed RBCs* memiliki potensi untuk digunakan sebagai indikator penting dalam menilai keparahan klinis beta thalassemia.

Saat ini, kemajuan dalam bidang genetika molekuler telah meningkatkan pemahaman mengenai hubungan variasi genetik dengan gejala klinis

thalassemia secara mendalam. Lebih dari 300 jenis mutasi pada gen β -globin telah berhasil diidentifikasi, yang mencakup mutasi pada *promoter*, proses *splicing* RNA, translasi, hingga mutasi *frameshift* dan *nonsense* yang menyebabkan gangguan sintesis protein (Jariwala et al., 2019). Selain mutasi utama tersebut, variasi genetik lain seperti *Single Nucleotide Polymorphism* (SNP) juga diketahui berperan dalam memodulasi ekspresi penyakit. Beberapa SNP, seperti SNP rs9399137 pada region HBS1L–MYB dan rs72872548 pada gen HBE1 telah dilaporkan memiliki keterkaitan dengan variasi kadar hemoglobin fetal (HbF) dan derajat keparahan beta-thalassemia, khususnya pada populasi Asia Tenggara (Munkongdee et al., 2021; Thein, 2018).

Berbagai penelitian telah mengkaji aspek patofisiologi dan genetika thalassemia secara luas. Namun demikian, hubungan antara parameter molekuler, terutama variasi genetik berbasis SNP, dengan manifestasi klinis derajat keparahan penyakit belum sepenuhnya dimengerti. Padahal, pemahaman yang komprehensif mengenai hal ini, berpotensi untuk meningkatkan ketepatan penilaian prognosis penyakit, sehingga dapat berimplikasi langsung terhadap strategi penatalaksanaan pasien. Selain itu, keterkaitan antara *PS-exposed RBCs* sebagai penanda kerusakan eritrosit dengan variasi genetik sebagai penentu derajat keparahan juga belum banyak diteliti secara bersamaan. Integrasi kedua penanda ini, berpotensi memberikan gambaran yang lebih komprehensif dalam menjelaskan heterogenitas klinis thalassemia, terutama pada populasi Indonesia yang memiliki karakteristik genetik yang berbeda dengan negara lain.

Oleh karena itu, peneliti tertarik untuk melakukan kajian terhadap keterkaitan antara variasi genetik berbasis SNP, khususnya rs9399137 dan rs72872548 dan *PS-exposed RBCs* dengan derajat keparahan beta thalassemia. Penelitian ini dilakukan untuk mengevaluasi potensi masing-masing parameter tersebut, secara tunggal maupun kombinasi, sebagai prediktor tingkat keparahan penyakit. Pendekatan ini diharapkan dapat memperkaya pemahaman mengenai mekanisme penyakit ini secara lebih komprehensif, serta mengembangkan model prediktif yang lebih akurat dan aplikatif berbasis molekuler.

B. Rumusan Masalah

Berdasarkan uraian dalam latar belakang masalah di atas, maka dirumuskan beberapa masalah penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Bagaimanakah variasi genotipe SNP rs9399137 pada pasien beta-thalassemia?
2. Bagaimanakah variasi genotipe SNP rs72872548 pada pasien beta-thalassemia?
3. Bagaimana sensitivitas dan spesifisitas variasi genotipe SNP rs9399137 sebagai prediktor tingkat keparahan pasien beta-thalassemia?
4. Bagaimana sensitivitas dan spesifisitas variasi genotipe SNP rs72872548 sebagai prediktor tingkat keparahan pasien beta-thalassemia?
5. Bagaimana sensitivitas dan spesifisitas ekspresi *phosphatidylserine* pada sel darah merah (*PS-Exposed RBCs*) sebagai prediktor tingkat keparahan pasien beta-thalassemia?
6. Bagaimana sensitivitas dan spesifisitas model kombinasi SNP rs9399137, SNP rs72872548 dan ekspresi *phosphatidylserine* pada sel darah merah (*PS-Exposed RBCs*) sebagai prediktor tingkat keparahan pasien beta-thalassemia?
7. Apakah terdapat perbedaan sensitivitas dan spesifisitas antara model prediktor tunggal dan model kombinasi SNP rs9399137, SNP rs72872548 dan ekspresi *phosphatidylserine* pada sel darah merah (*PS-Exposed RBCs*) dalam menentukan tingkat keparahan pasien beta-thalassemia?

C. Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk:

1. Mengidentifikasi variasi genotipe SNP rs9399137 pada pasien beta-thalassemia.
2. Mengidentifikasi variasi genotipe SNP rs72872548 pada pasien beta-thalassemia.
3. Menganalisis sensitivitas dan spesifisitas variasi genotipe SNP rs9399137 sebagai prediktor tingkat keparahan pasien beta-thalassemia.
4. Menganalisis sensitivitas dan spesifisitas variasi genotipe SNP

rs72872548 sebagai prediktor tingkat keparahan pasien beta-thalassemia.

5. Menganalisis sensitivitas dan spesifisitas ekspresi *phosphatidylserine* pada sel darah merah (*PS-Exposed RBCs*) sebagai prediktor tingkat keparahan pasien beta-thalassemia.
6. Menganalisis sensitivitas dan spesifisitas model kombinasi SNP rs9399137, SNP rs72872548 dan ekspresi *phosphatidylserine* pada sel darah merah (*PS-Exposed RBCs*) sebagai prediktor tingkat keparahan pasien beta-thalassemia.
7. Menganalisis perbedaan sensitivitas dan spesifisitas antara model prediktor tunggal dan model kombinasi SNP rs9399137, SNP rs72872548 dan ekspresi *phosphatidylserine* pada sel darah merah (*PS-Exposed RBCs*) dalam menentukan tingkat keparahan pasien beta-thalassemia.

D. Manfaat Penelitian

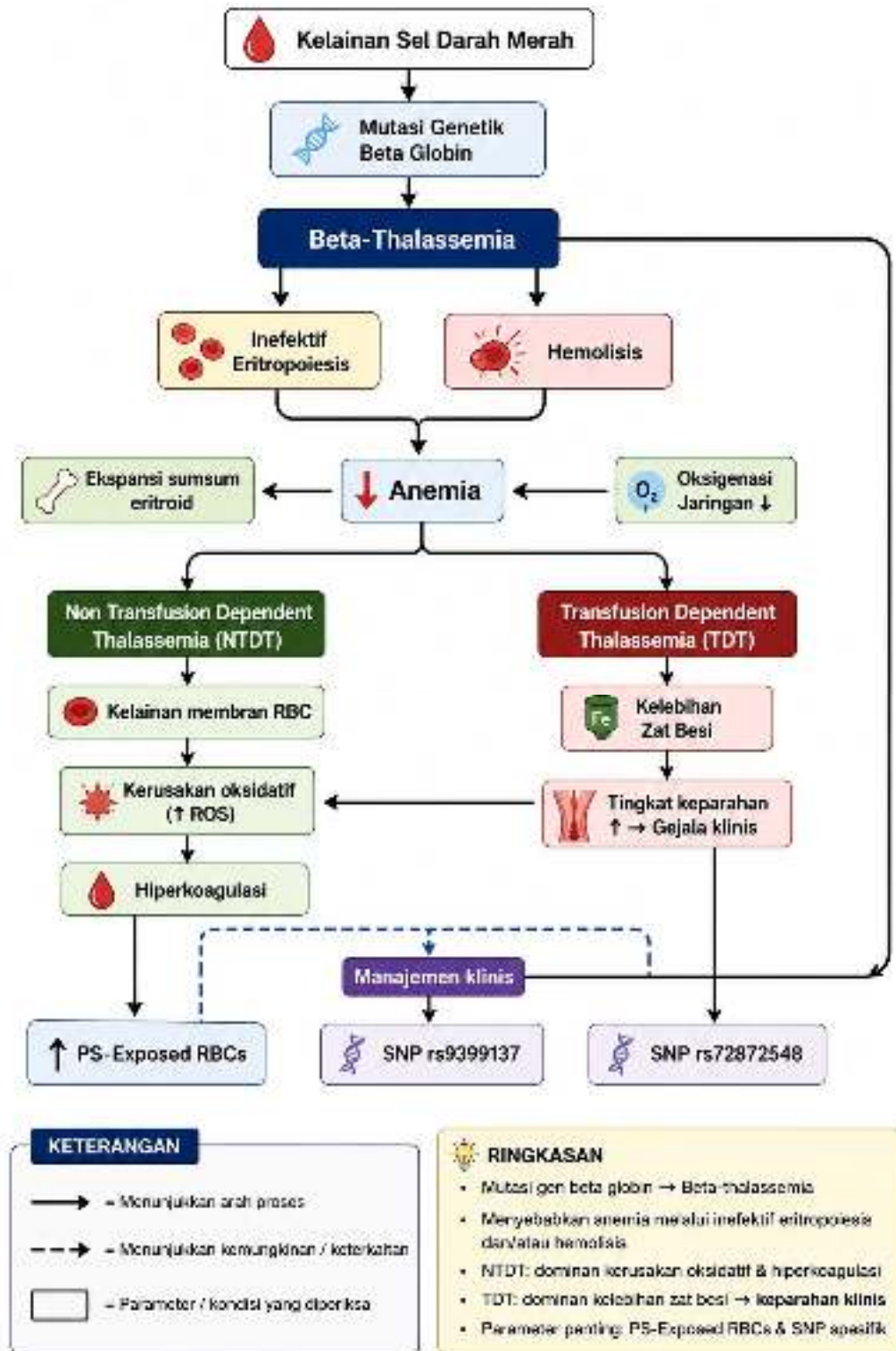
1. Meningkatkan kesadaran masyarakat mengenai penyakit thalassemia dan jenisnya yang terjadi akibat pernikahan antar etnis dengan mengembangkan metode deteksi yang beragam.
2. Menambah pengetahuan mengenai pemeriksaan kombinasi secara genetik biomolekuler sebagai model prediktor tingkat keparahan pasien beta thalassemia untuk penanganan yang lebih tepat dan mencegah komplikasi lanjut.
3. Mengembangkan model prediktor tingkat keparahan untuk penguatan genetik konseling dan prenatal *screening* Thalassemia.

E. Kebaruan Penelitian

Kebaruan penelitian ini dalam konteks disertasi “Performa Diagnostik *Single Nucleotide Polymorphism* (SNP) rs9399137 Dan rs72872548 Dengan Ekspresi *Phosphatidylserine* Pada Sel Darah Merah (*Ps-Exposed Rbcs*) Sebagai Model Prediktor Tingkat Keparahannya Beta-Thalassemia” dapat dijelaskan sebagai berikut:

1. Penelitian ini merupakan studi pertama di Indonesia, terutama di Provinsi Lampung yang melaporkan distribusi variasi genetik SNP rs9399137 dan rs72872548 pada pasien beta-thalassemia menggunakan metode sekuensing Sanger. Hasil penelitian ini memberikan data molekuler pada populasi penderita beta-thalassemia lokal di Provinsi Lampung yang sebelumnya belum tersedia.
2. Penelitian ini merupakan studi pertama yang mengintegrasikan analisis ekspresi *Phosphatidylserine* pada sel darah merah (*PS-Exposed RBCs*) berbasis ELISA sebagai biomarker membran eritrosit dengan variasi genetik SNP rs9399137 dan rs72872548 dalam menentukan tingkat keparahan beta-thalassemia.
3. Penelitian ini mengembangkan desain primer spesifik hasil perancangan mandiri untuk amplifikasi SNP rs72872548.
4. Penelitian ini menghasilkan model prediktif menggunakan kombinasi biomarker genetik (SNP rs9399137 dan rs72872548) dan biomarker kerusakan membran sel eritrosit (*PS-exposed RBCs*) yang menunjukkan kemampuan diskriminatif tinggi dalam menentukan tingkat keparahan beta-thalassemia. Model prediktif ini berpotensi digunakan sebagai skrining risiko komplikasi beta-thalassemia secara dini.

F. Kerangka Konseptual Penelitian



Gambar 1. Kerangka Konseptual Penelitian

G. Hipotesis

- H0₁: Tidak terdapat hubungan antara variasi genotipe SNP rs9399137 dengan tingkat keparahan pasien beta-thalassemia.
- H1₁: Terdapat hubungan antara variasi genotipe SNP rs9399137 dengan tingkat keparahan pasien beta-thalassemia.
- H0₂: Tidak terdapat hubungan antara variasi genotipe SNP rs72872548 dengan tingkat keparahan pasien beta-thalassemia.
- H1₂: Terdapat hubungan antara variasi genotipe SNP rs72872548 dengan tingkat keparahan pasien beta-thalassemia.
- H0₃: Variasi genotipe SNP rs9399137 tidak memiliki sensitivitas dan spesifisitas yang bermakna dalam memprediksi tingkat keparahan beta-thalassemia.
- H1₃: Variasi genotipe SNP rs9399137 memiliki sensitivitas dan spesifisitas yang bermakna dalam memprediksi tingkat keparahan beta-thalassemia.
- H0₄: Variasi genotipe SNP rs72872548 tidak memiliki sensitivitas dan spesifisitas yang bermakna dalam memprediksi tingkat keparahan beta-thalassemia.
- H1₄: Variasi genotipe SNP rs72872548 memiliki sensitivitas dan spesifisitas yang bermakna dalam memprediksi tingkat keparahan beta-thalassemia.
- H0₅: Ekspresi *PS-exposed RBCs* tidak memiliki sensitivitas dan spesifisitas yang bermakna dalam memprediksi tingkat keparahan beta-thalassemia.
- H1₅: Ekspresi *PS-exposed RBCs* memiliki sensitivitas dan spesifisitas yang bermakna dalam memprediksi tingkat keparahan beta-thalassemia.
- H0₆: Model kombinasi SNP rs9399137, rs72872548, dan *PS-exposed RBCs* tidak memiliki sensitivitas dan spesifisitas yang bermakna dalam memprediksi tingkat keparahan beta-thalassemia.
- H1₆: Model kombinasi SNP rs9399137, rs72872548, dan *PS-exposed RBCs* memiliki sensitivitas dan spesifisitas yang bermakna dalam

memprediksi tingkat keparahan beta-thalassemia.

H0₇: Tidak terdapat perbedaan sensitivitas dan spesifisitas antara model prediktor tunggal dan model kombinasi dalam memprediksi tingkat keparahan beta-thalassemia.

H1₇: Terdapat perbedaan sensitivitas dan spesifisitas antara model prediktor tunggal dan model kombinasi dalam memprediksi tingkat keparahan beta-thalassemia.

II. TINJAUAN PUSTAKA

A. Beta-Thalassemia

Beta-thalassemia merupakan kelainan genetik yang diturunkan dan menyebabkan adanya gangguan pada sintesis hemoglobin, yang ditandai dengan defisiensi rantai beta-globin (Hershko & Rachmilewitz, 1979). Penyakit ini termasuk dalam kelompok gangguan sistem hematologi yang sering dibahas bersama hemoglobinopati. Hemoglobinopati sendiri dapat didefinisikan sebagai kelainan struktur hemoglobin yang dapat mempengaruhi fungsi serta kelangsungan hidup sel darah merah. Berbeda dengan hemoglobinopati yang berkaitan dengan perubahan struktur hemoglobin, thalassemia berkaitan dengan kelainan jumlah komponen penyusun hemoglobin (Brancaleoni et al., 2016).

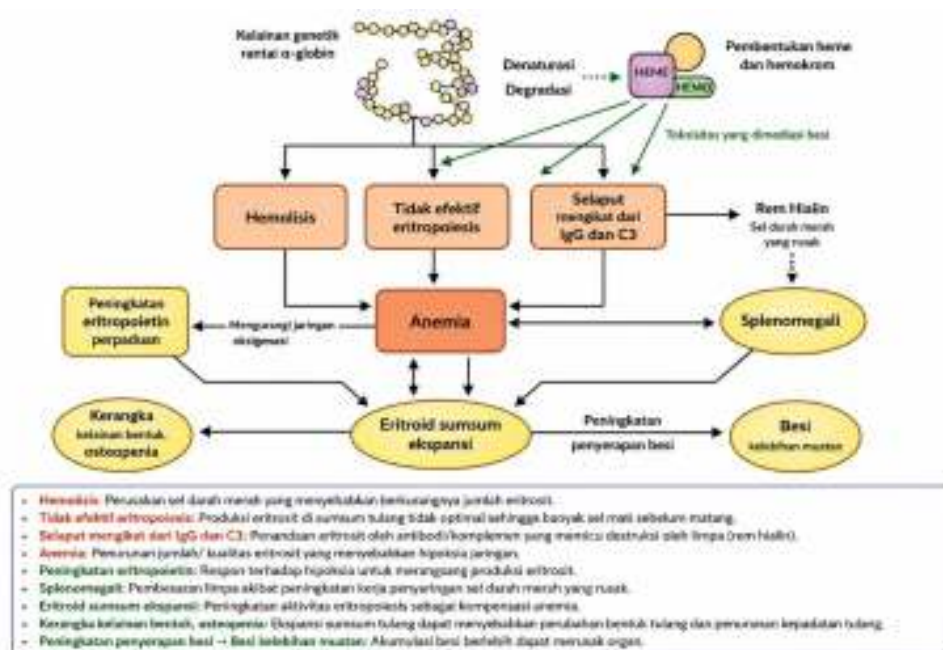
Sebagian besar kasus thalassemia diwariskan secara resesif menurut hukum Mendel. Individu heterozigot umumnya mengalami anemia ringan yang dikategorikan sebagai thalassemia minor, sedangkan individu homozigot mengalami anemia berat dengan berbagai derajat keparahan yang dikenal sebagai beta-thalassemia mayor (Karakukcu et al., 2015). Secara patofisiologis, beta-thalassemia disebabkan oleh berkurangnya produksi rantai globin β (β^+) atau tidak adanya produksi rantai β sama sekali (β^0). Kondisi ini mengganggu pembentukan tetramer hemoglobin normal, yang seharusnya terdiri dari dua rantai globin α dan dua rantai globin β (Cao & Galanello, 2010).

1. Patofisiologis Thalassemia

Thalassemia terjadi akibat adanya ketidakseimbangannya produksi rantai α dan non α . Pada kondisi normal, rasio antara rantai α dan non α adalah 1 banding 1 (Munkongdee et al., 2021). Ketika produksi rantai globin dalam sel darah merah berkurang, rantai yang diproduksi secara normal tidak dapat membentuk heterotetramer hemoglobin yang seimbang. Kekurangan produksi rantai α -globin, menyebabkan akumulasi rantai β -globin (α -thalassemia). Sebaliknya,

kekurangan produksi rantai β -globin menyebabkan akumulasi rantai α -globin (β -thalassemia) (Hershko & Rachmilewitz, 1979).

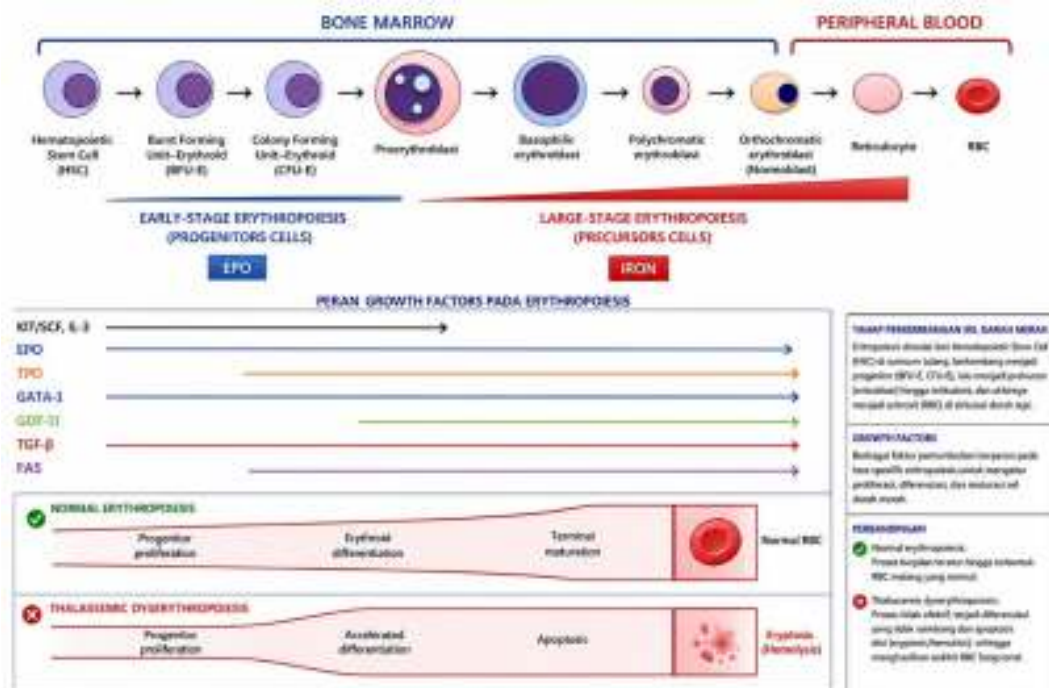
Pada beta-thalassemia, jumlah rantai β -like lebih sedikit daripada jumlah rantai α (Gambar 5). Tingkat ketidakseimbangan ini sejalan dengan derajat keparahan penyakit (Munkongdee *et al.*, 2021). Oleh karena itu, adanya gangguan biosintetik globin menjadi penentu utama tingkat keparahan penyakit, bahkan lebih signifikan dibandingkan dengan produksi hemoglobin yang rendah (Benites *et al.*, 2019). Secara molekuler, selama proses sintesis, α -globin akan berinteraksi dengan protein pendamping (*molecular chaperone*) yang disebut *α -hemoglobin stabilizing protein* (AHSP) untuk membentuk kompleks protein, sebelum molekul tersebut berikatan dengan rantai β -globin dan membentuk tetramer hemoglobin (Silberstein *et al.*, 2014). AHSP berperan dalam memfasilitasi pelipatan α -globin serta mencegah terbentuknya agregat protein yang salah lipat. Mutasi pada α -globin yang mengganggu interaksi dengan AHSP diketahui berhubungan dengan mikrositosis dan anemia pada manusia (Singha *et al.*, 2019). Selain itu, kehilangan fungsi AHSP juga terbukti mengganggu proses eritropoiesis pada model tikus β -thalassemia. Penelitian menunjukkan bahwa kadar AHSP dapat memengaruhi fenotip klinis β -thalassemia (Eldor & Rachmilewitz, 2002).



Gambar 2. Patofisiologi Beta-Thalassemia
(Sumber: Eldor & Rachmilewitz, 2002; Wautier *et al.*, 2011)

Pada thalassemia, produksi hemoglobin terganggu akibat sintesis rantai globin yang tidak seimbang, baik karena berkurangnya maupun tidak adanya salah satu jenis rantai globin. Kondisi ini menyebabkan penurunan nilai mean corpuscular hemoglobin (MCH) dan mean corpuscular volume (MCV) (Rivella, 2009). Pada β -thalassemia, kelebihan rantai globin α (bukan β) menjadi faktor utama yang bersifat toksik, karena mengakibatkan destruksi dini sel darah merah, baik di dalam sumsum tulang maupun secara ekstraseluler. Proses ini dikenal sebagai *ineffective erythropoiesis*, yang merupakan karakteristik utama β -thalassemia (Wautier et al., 2011).

Respons terhadap *ineffective erythropoiesis* dan anemia ditandai dengan peningkatan produksi eritropoetin yang merangsang hiperplasia eritroid. Kondisi ini dalam jangka panjang dapat menyebabkan deformitas skeletal, osteoporosis, pembentukan massa ekstraseluler, serta splenomegali. Selain itu, anemia kronis juga dapat berkontribusi terhadap komplikasi seperti gagal jantung. Eritropoiesis yang tidak efektif turut meningkatkan penyerapan zat besi di usus, yang dimediasi oleh penurunan kadar hepsidin—suatu hormon peptida yang diproduksi oleh hepatosit dan berperan penting dalam regulasi homeostasis zat besi (Zainuddin et al., 2015).

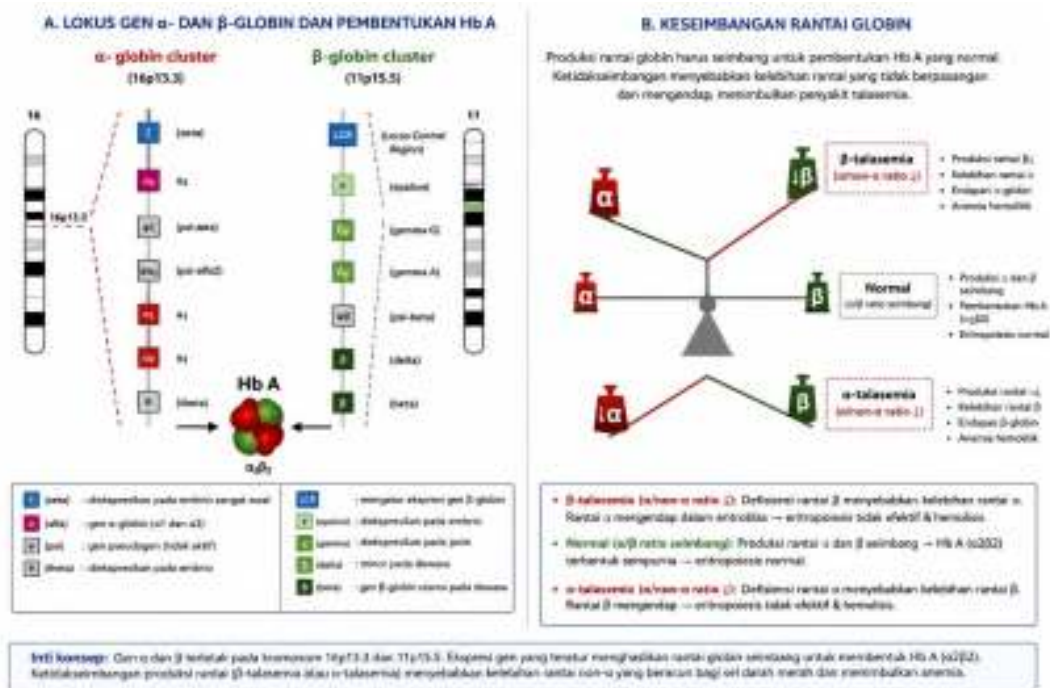


Gambar 3. Skema Eritropoiesis (Sumber: Datar et al., 2015)

Selama perkembangan eritroid, terjadi serangkaian tahapan yang melibatkan jaringan molekuler kompleks, termasuk eritropoietin (EPO), besi, dan berbagai faktor transkripsi (Datar et al., 2015). Pada tahap awal eritropoiesis, khususnya setelah pembentukan *burst-forming unit-erythroid* (BFU-E), EPO berperan sebagai regulator utama. Pada fase ini, faktor transkripsi GATA-1 turut mempromosikan diferensiasi eritroid serta meningkatkan ekspresi reseptor EPO.

Seiring dengan perkembangan eritropoiesis, molekul lain seperti transferin dan *growth differentiation factor 11* (GDF11) juga berperan dalam proses proliferasi dan diferensiasi sel eritroid. Regulasi eritropoiesis tidak hanya bersifat stimulatif, tetapi juga melibatkan mekanisme penghambatan. Ekspansi eritroid dapat dihambat melalui interaksi antara reseptor FAS dan ligan FAS yang memicu apoptosis pada sel eritroid imatur. Selain itu, GDF11 dan anggota keluarga *transforming growth factor-beta* (TGF- β) lainnya, berperan sebagai regulator negatif yang menghambat diferensiasi dan pematangan eritrosit dari tahap awal hingga akhir (Datar et al., 2015).

Gambar 4 menjelaskan lokus gen alfa globin dan beta globin, lokasi kromosomnya, urutan ekspresi gen selama perkembangan manusia, serta pembentukan HbA. Gambar ini penting dalam memahami patogenesis thalassemia terutama beta-thalassemia. *α -globin cluster* terletak pada kromosom 16p13.3 yang artinya kromosom nomor 16, lengan pendek (p) dan regio 13.3, fungsi gen α -globin menghasilkan rantai α hemoglobin. Pada manusia normal terdapat 4 gen α dan masing-masing kromosom 16 membawa $\alpha 1$ dan $\alpha 2$ sehingga total $\alpha\alpha/\alpha\alpha$, karena kebutuhan rantai α sangat besar selama eritropoiesis maka $\alpha 2$ lebih aktif dibandingkan $\alpha 1$ dan produksi α harus seimbang dengan β . Ketidakseimbangan akan menyebabkan presipitasi rantai globin dan terjadi hemolisis. Sedangkan *β -globin cluster* berlokasi di kromosom 11p15.5. Susunan gen β -globin salah satunya adalah *locus control region* (LCR) yaitu daerah regulator penting yang berfungsi mengontrol ekspresi gen β -globin, membuka struktur kromatin, mengatur *switching* hemoglobin. Tanpa LCR, gen β tidak dapat ditranskripsi secara optimal. LCR bekerja melalui *enhancer*, *looping* DNA dan interkasi faktor transkripsi. (Angastiniotis & Lobitz, 2019)



Gambar 4. Struktur kluster gen α dan β (A) dan patofisiologi thalassemia (B) (Sumber: Angastiniotis & Lobitz, 2019)

Derajat anemia sangat bervariasi, bergantung pada jenis dan kombinasi mutasi gen pada setiap individu. Hingga saat ini, terdapat lebih dari 200 mutasi pada kluster gen β -globin. Mutasi yang tidak menghasilkan rantai β -globin sama sekali, disebut mutasi β^0 , sedangkan mutasi yang masih menghasilkan sebagian rantai β -globin disebut sebagai mutasi β^+ dan β^{++} (Datar *et al.*, 2015).

Pada kasus anemia berat, terapi utama yang diberikan adalah transfusi darah. Pada *Thalassemia Transfusion Dependent* (TDT), transfusi biasanya dimulai dari masa anak-anak, sehingga berisiko menyebabkan penumpukan zat besi dalam tubuh. Adanya kelebihan zat besi ini, khususnya dalam bentuk zat besi bebas atau yang disebut *labile plasma iron* (LPI), dapat memicu pembentukan spesies oksigen reaktif (ROS) yang mengakibatkan kerusakan organ dan kematian sel (apoptosis), terutama hepatosit, kardiomyosit dan sel-sel kelenjar endokrin (Angastiniotis & Lobitz, 2019). Sementara itu, pada *Non Transfusion Dependent Thalassemia* (NTDT), kelebihan zat besi terjadi secara sekunder,

akibat adanya peningkatan zat besi dari saluran pencernaan, meskipun tanpa melalui transfusi rutin (Hershko & Rachmilewitz, 1979).

2. Hemoglobin Thalassemia

Hemoglobin E (HbE) merupakan varian hemoglobin yang ditandai oleh substitusi asam amino lisin menggantikan asam glutamat pada posisi ke-26 rantai β -globin. Varian hemoglobin ini sangat umum di Asia Tenggara (Karakukcu *et al.*, 2015). Individu dengan HbE, baik heterozigot maupun homozigot, umumnya menunjukkan gambaran sel eritrosit yang hipokromik dan mikrositik. Secara molekuler, mutasi HbE terjadi akibat perubahan kodon GAG menjadi AAG pada posisi ke-26 gen β -globin. Perubahan ini tidak hanya menyebabkan substitusi asam amino, tetapi juga menciptakan situs *donor splicing* alternatif yang lemah. Akibatnya, proses penyambungan (*splicing*) intron 1 menjadi tidak efisien dan menghasilkan mRNA yang tidak normal. Hal ini akan menurunkan akumulasi mRNA β -globin (Rujito, 2019).

Kombinasi heterozigositas antara HbE dan mutasi β -thalassemia (HbE/ β -thalassemia) merupakan salah satu bentuk yang cukup sering ditemukan. Kombinasi ini, bahkan menyumbang hampir 50% kasus β -thalassemia berat di seluruh dunia. Genotipe ini sangat umum ditemukan pada beberapa negara Asia Tenggara, dan juga ditemukan pada populasi diaspora Asia, misalnya di Amerika Serikat (Karakukcu *et al.*, 2015).

Fenotipe klinis HbE/ β -thalassemia sangat bervariasi. Sebagian pasien dapat hidup tanpa kebutuhan transfusi, sementara sebagian lainnya memerlukan transfusi sejak usia dini. Variabilitas ini mencerminkan heterogenitas klinis yang tinggi, sehingga pendekatan manajemen pasien perlu disesuaikan secara individual (Weatherall & Clegg, 2001).



Gambar 5. Perubahan Gen Globin Pada Pasien Thalassemia
(Sumber: Weatherall *et al.*, 2001).

3. Pemeriksaan Laboratorium Diagnosa Thalassemia

Diagnosis laboratorium thalassemia memerlukan beberapa pemeriksaan, termasuk analisis indeks sel darah merah, kadar hemoglobin, serta analisis DNA. Pemeriksaan sel darah merah menggunakan *hematology analyzer* umumnya menunjukkan adanya mikrositosis dan penurunan kandungan hemoglobin dalam eritrosit, yang merupakan salah satu indikator thalassemia. Namun demikian, temuan tersebut juga dapat dijumpai pada kondisi defisiensi besi, sehingga membedakan antara thalassemia trait dan anemia defisiensi besi menjadi suatu tantangan diagnostik. Oleh karena itu, diperlukan pemeriksaan lanjutan untuk memastikan diagnosis secara akurat (Munkongdee *et al.*, 2020).

a. *Complete Blood Count* (CBC)

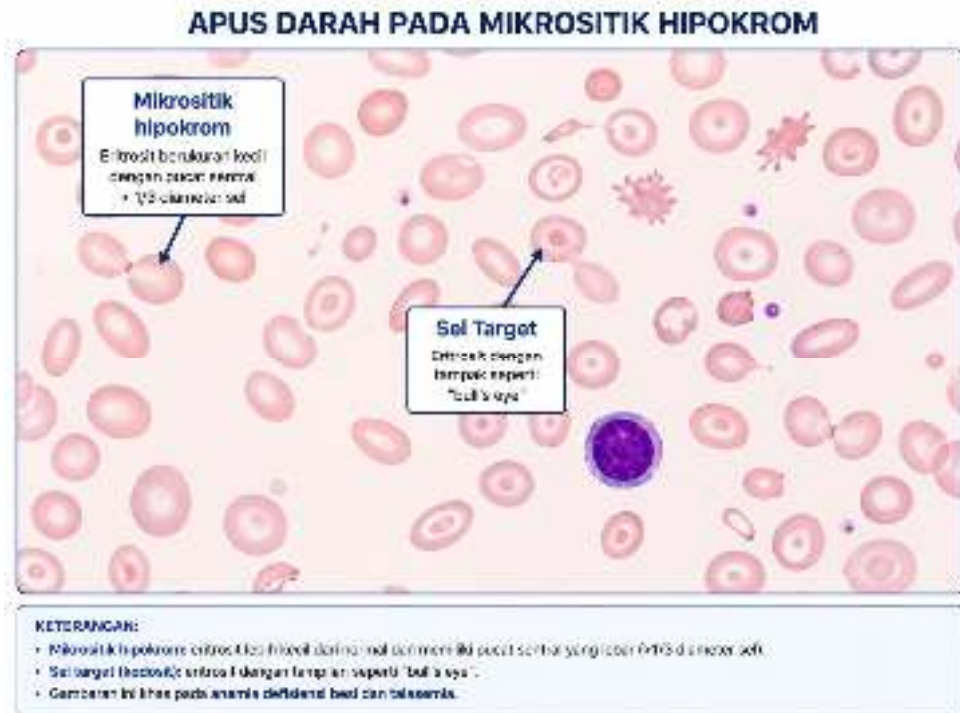
Anemia pada thalassemia mayor umumnya bersifat berat, dengan kadar hemoglobin (Hb) < 7 g/dL. Meskipun demikian, tidak semua hemoglobinopati menunjukkan perubahan khas pada indeks eritrosit. Sebagai contoh, varian seperti Hb *Constant Spring* dapat memiliki nilai *mean corpuscular volume* (MCV) dan *mean corpuscular hemoglobin* (MCH) yang masih dalam batas normal, sehingga nilai normal tersebut tidak dapat

sepenuhnya menyingkirkan kemungkinan thalassemia trait maupun hemoglobinopati (Shang et al., 2017).

Indeks eritrosit merupakan langkah awal yang penting dalam skrining pembawa sifat thalassemia (*trait*), termasuk thalassemia $\delta\beta$ dan *hereditary persistence of fetal hemoglobin* (HPFH). Secara umum, nilai MCV < 80 fL menunjukkan mikrositosis, sedangkan MCH < 27 pg menunjukkan kondisi hipokromik. Pada thalassemia mayor, nilai MCV biasanya berkisar antara 50–60 fL dan MCH antara 12–18 pg. Sayangnya, penurunan nilai MCV dan MCH tidak spesifik hanya untuk thalassemia, karena kondisi ini juga dapat ditemukan pada anemia defisiensi besi. Pada praktiknya, MCH sering dianggap lebih andal sebagai parameter skrining karena nilainya dianggap relatif kurang dipengaruhi oleh variasi cadangan besi dibandingkan dengan MCV.

b. Gambaran Darah Tepi

Gambaran apusan darah tepi pada penderita thalassemia, menunjukkan adanya kelainan eritrosit yang khas, seperti anisositosis dan poikilositosis, termasuk fragmentosit dan *teardrop cells*. Selain itu, ditemukan gambaran mikrositik hipokrom, basophilic stippling, *Pappenheimer body*, sel target, serta sel eritrosit berinti yang mencerminkan adanya gangguan hemoglobinasi dan diseritropoiesis. Selain itu, jumlah leukosit total dan neutrofil juga dapat meningkat. Namun demikian, pada kondisi yang lebih lanjut, seperti hipersplenisme, dapat ditemukan leukopenia, neutropenia, serta trombositopenia (Yu et al., 2007).



Gambar 6. Apusan Darah Tepi Beta-Thalassemia/ HBE Heterozigot
(Sumber: Bajwa & Basith, 2023)

c. Red Cell Distribution Width (RDW)

Red cell distribution width (RDW) merupakan parameter yang menggambarkan variasi ukuran eritrosit dalam sirkulasi. Pada anemia defisiensi besi, RDW umumnya meningkat (>14,5%) akibat adanya variasi ukuran sel yang signifikan, meskipun peningkatannya biasanya tidak setinggi pada thalassemia mayor (Petrou, 2010). Pada thalassemia *trait*, eritrosit cenderung mikrositik tetapi relatif seragam, sehingga peningkatan RDW umumnya minimal atau tidak terlalu mencolok. Sebaliknya, pada thalassemia mayor dan intermedia, RDW meningkat secara signifikan, mencerminkan derajat anisitosis yang lebih berat.

d. Retikulosit

Jumlah retikulosit mencerminkan aktivitas eritropoiesis di sumsum tulang. Pada pasien thalassemia, jumlah retikulosit umumnya meningkat sebagai respons terhadap anemia dan peningkatan aktivitas sumsum tulang. Sebaliknya, pada anemia defisiensi besi, jumlah retikulosit cenderung rendah akibat terbatasnya ketersediaan besi untuk sintesis hemoglobin.

e. ***High Performance Liquid Chromatography (HPLC)***

Analisis Hb dapat dilakukan menggunakan *high-performance liquid chromatography* (HPLC) atau *capillary zone electrophoresis* (CE). Kedua metode ini mampu memberikan analisis kualitatif dan kuantitatif komponen hemoglobin secara cepat dan akurat. Secara teoritis, genotipe thalassemia dapat diperkirakan melalui rasio rantai globin α dan β atau rasio mRNA α/β , namun pendekatan ini masih bersifat presumtif. Oleh karena itu, analisis DNA tetap menjadi metode definitif untuk mengidentifikasi mutasi thalassemia secara spesifik (Lin et al., 2020). Pemeriksaan HPLC atau CE juga berperan sebagai alat kuantitatif untuk mengukur fraksi HbA₂ dan HbF, yang penting dalam identifikasi varian hemoglobin secara presumtif. Namun, interpretasi hasilnya tetap harus dikorelasikan dengan kondisi klinis pasien. Selain itu, pemeriksaan lanjutan juga diperlukan jika ditemukan varian hemoglobin yang relevan (Lin et al., 2020). Pada β -thalassemia berat, HbF umumnya dominan (>90%), kecuali pada pasien yang baru saja menerima transfusi darah dalam jumlah besar. HbA dapat tidak terdeteksi pada individu dengan genotipe β^0 homozigot, sedangkan pada β^+ masih dapat ditemukan dalam jumlah kecil. Peningkatan kadar HbA₂ merupakan parameter penting dalam diagnosis β -thalassemia *trait* (He et al., 2019). Secara umum, interpretasi pemeriksaan fraksi Hb sebagai berikut:

- 1) Kadar HbA₂ mencerminkan derajat kelainan genetik yang terjadi.
- 2) Nilai HbA₂ 3,6-4,2% biasanya ditemukan pada β^+ ringan.
- 3) Nilai HbA₂ 4-9% pada thalassemia heterozigot β^0 dan β^+ berat.
- 4) Kadar HbA₂ yang tinggi (> 20%) mengindikasikan adanya varian HbE. Jika fraksi Hb yang dominan adalah HbF dan HbE, maka temuan tersebut mendukung diagnosis β -thalassemia/HbE.

HASIL ANALISIS HPLC HEMOGLOBIN

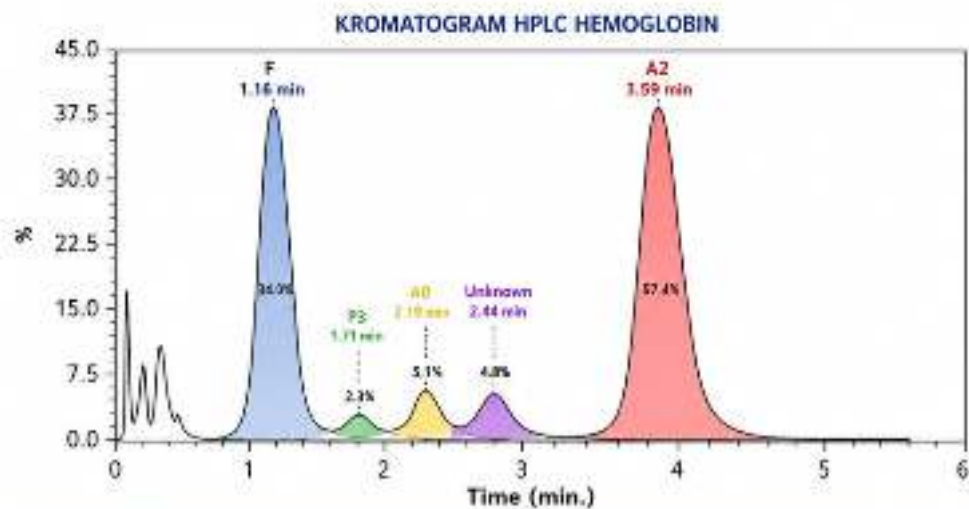
Peak Name	Calibrated Area %	Retention Area %	Peak Time (min)	Peak Area
F	34.0*	---	1.16	691,496
P3	---	2.3	1.71	46,068
A0	---	5.1	2.19	103,546
Unknown	---	4.8	2.44	97,764
A2	57.4*	---	3.59	1,099,387

Total Area: 2,038,282

F Concentration = 34.0* %

A2 Concentration = 57.4* %

* Values outside of expected ranges



Interpretasi:

- Fraksi F (HbF) = 34.0% → meningkat (di atas rentang normal).
- Fraksi A2 (HbA₂) = 57.4% → meningkat (di atas rentang normal).
- Hasil ini konsisten dengan **β-talasemia (β-thalassemia trait / intermedia)**.

Catatan: Rentang normal HbF < 1% (dewasa), HbA₂ = 2.0-3.5%.

Gambar 7. Gambaran Analisis Hb Metode HPLC (Sumber: <https://myhematology.com/>)

Kromatogram HPLC ini menggambarkan individu dengan kadar HbA₂ yang tinggi, yang dapat mengindikasikan kemungkinan homozigot Hb E. HbA₂, merupakan komponen hemoglobin minor yang pada individu normal berkisar antara 1,5-3,5% dari total hemoglobin. Namun demikian, pada individu dengan homozigot Hb E, kadar HbA₂ dapat meningkat secara signifikan, mencapai hingga 20% atau lebih.

Meskipun demikian, kadar HbA₂ yang normal tidak serta merta menyingkirkan diagnosis thalassemia. Hal ini disebabkan oleh beberapa faktor sebagai berikut:

- 1) Kadar HbA₂ dapat tampak lebih rendah dari nilai sebenarnya pada kondisi defisiensi besi. Oleh karena itu, koreksi defisiensi besi perlu dilakukan terlebih dahulu sebelum pemeriksaan HPLC diulang untuk mendapatkan hasil yang lebih akurat (Cao & Galanello, 2010).
- 2) Kadar feritin serum yang rendah merupakan indikator adanya defisiensi besi, namun tidak menyingkirkan kemungkinan thalassemia trait. Apabila defisiensi besi telah disingkirkan, kadar HbA₂ tetap normal, tetapi indeks eritrosit masih menunjukkan gambaran yang konsisten dengan thalassemia, maka perlu dipertimbangkan kemungkinan thalassemia α atau koeksistensi antara β -thalassemia dan δ -thalassemia (Brancaleoni et al., 2016)..

f. Elektroforesis Hemoglobin

Pemeriksaan elektroforesis hemoglobin (Hb) dapat dilakukan dengan berbagai metode, antara lain elektroforesis Hb varian secara kuantitatif menggunakan *cellulose acetate membrane*, pengukuran HbA₂ secara kuantitatif dengan metode mikrokolom, serta penentuan kadar HbF menggunakan metode denaturasi alkali modifikasi Betke (2 menit). Selain itu, metode modern seperti *capillary hemoglobin electrophoresis* juga semakin banyak digunakan karena memberikan hasil yang lebih cepat dan akurat. Secara prinsip, elektroforesis hemoglobin bekerja dengan memisahkan fraksi hemoglobin berdasarkan perbedaan muatan listriknya dalam medium tertentu, umumnya pada kondisi pH alkali. Pada kondisi ini, molekul hemoglobin akan bermigrasi dengan kecepatan yang berbeda, sehingga memungkinkan identifikasi berbagai jenis hemoglobin (Taher & Saliba, 2017).

g. Analisis DNA

Analisis DNA dalam mendiagnosa thalassemia telah berkembang pesat dalam 40 tahun terakhir. Metode yang digunakan meliputi teknik klasik seperti *Southern blotting*, amplifikasi *polymerase chain reaction* (PCR), *restriction fragment length polymorphism* (RFLP), *amplification refractory*

mutation system (ARMS), hingga *direct sequencing*. Saat ini, teknologi *next-generation sequencing* (NGS) memungkinkan analisis genom secara menyeluruh untuk mendeteksi berbagai jenis mutasi, termasuk mutasi titik, delesi, insersi, dan translokasi (Cappellini *et al.*, 2014). Pemeriksaan DNA berperan penting dalam memastikan jenis mutasi yang mendasari thalassemia, dan pada kondisi tertentu dapat menjadi metode diagnostik definitif, terutama ketika hasil pemeriksaan hematologi dan analisis hemoglobin tidak memberikan gambaran yang jelas (Brancaleoni *et al.*, 2016). Oleh karena itu, analisis DNA merupakan bagian dari upaya diagnosis molekular thalassemia, yang dilakukan pada kasus atau kondisi tertentu.

Analisis DNA terutama diperlukan pada kondisi di mana diagnosis tidak dapat ditegakkan secara pasti melalui pemeriksaan hematologi, antara lain:

- 1) Diagnosis β -thalassemia mayor yang telah banyak menerima transfusi berulang, sehingga hasil analisis hemoglobin menjadi tidak representatif.
- 2) Pemeriksaan ini digunakan untuk mengonfirmasi status pembawa sifat melalui identifikasi mutasi pada kedua orang tua.
- 3) Identifikasi karier dari β -thalassemia silent, β -thalassemia dengan HbA₂ normal, thalassemia α^0 , dan beberapa thalassemia α^+ .
- 4) Identifikasi varian hemoglobin yang jarang.
- 5) Keperluan konseling genetik dan diagnosis prenatal.

h. Pemeriksaan Molekular Thalassemia

Tes molekular yang umum digunakan pada pemeriksaan hemoglobinopati yakni RFLP, SNP prediktif, diskriminasi alel menggunakan *Real Time PCR end point dan sekuensing DNA* (Panigrahy *et al.*, 2016).

1) Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)

Keuntungan penggunaan metode ini yakni mudah digunakan dan biaya yang murah. Sangat cocok digunakan pada laboratorium kecil. Keterbatasan metode ini adanya restriksi parsial (pemotongan yang tidak sempurna) pada DNA yang dapat mengakibatkan spesimen

homozigot diinterpretasikan secara tidak benar (Panigrahy *et al.*, 2016).

2) *Genotyping Single Nucleotide Polymorphism (SNP)*

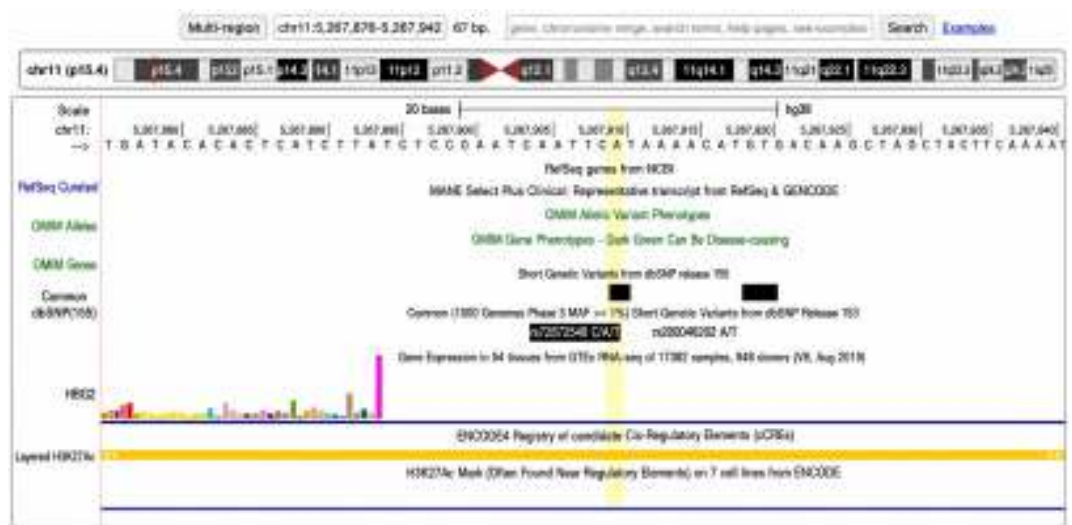
Single Nucleotide Polymorphism (SNP) merupakan sebuah kode genetik tunggal yang diketahui sebagai bentuk paling umum dari modifikasi nukleotida dan sebagian besar terletak di dalam gen atau di wilayah pengatur di dekat gen dan dapat memengaruhi fungsi gen yang peranannya lebih langsung dalam penyakit (Kaur *et al.*, 2019). Pengembangan SNP untuk metode diagnosa penyakit mulai banyak digunakan di dunia medis sejak beberapa tahun terakhir pada berbagai jenis penyakit termasuk beta-thalassemia ini. SNP berasosiasi dengan region yang gen yang menjadi tolak ukur diagnosa penyakit tersebut. Deteksi SNP pada beta-thalassemia sebelumnya telah menghasilkan penemuan berupa kode SNP rs9399137 dan rs72872548 yang berasosiasi dengan region gen yang mendeteksi adanya gangguan pada hematopoiesis yaitu HBS1L-MYB dan region gen yang berhubungan dengan transportasi oksigen dari darah yaitu HbE1 (Panigrahy *et al.*, 2016). Pada gambar 8 terlihat SNP rs9399137 berada pada kromosom 6q23.3. Wilayah ini dikenal sebagai HBS1L-MYB intergenic region (HMIP) salah satu lokus regulator HbF paling konsisten dilaporkan pada berbagai populasi dunia. Daerah ini mengatur ekspresi gen MYB, yaitu faktor transkripsi penting dalam proliferasi dan maturase eritroid. Penurunan ekspresi MYB diketahui berhubungan dengan peningkatan HbF, maturasi eritroid lebih baik, penurunan *ineffective erythropoiesis*. SNP rs9399137 juga berada pada area dengan sinyal H3K27Ac yang menunjukkan fungsi regulatori aktif. (<https://genome.ucsc.edu>).

Gambar 9 SNP rs72872548 terletak pada kromosom 11p15.4. Wilayah ini sangat penting karena merupakan β -globin gen *cluster*, tempat gen-gen globin berada termasuk HBG2, HBG1 dan HBB. SNP ini berada dekat gen HBG2, yaitu gen gamma globin yang menyusun HbF. Peningkatan HbF pada pasien beta-thalassemia dapat mengurangi ketidakseimbangan rantai globin dan memperbaiki anemia. Pada *track epigenetic* tampak sinyal H3K27Ac yang merupakan penanda *enhancer*

aktif. Ini menunjukkan bahwa wilayah rs72872548 berfungsi sebagai regulator ekspresi gen, bukan sekedar variasi netral, sehingga SNP ini secara biologis berpotensi memengaruhi kadar HbF dan keparahan klinis pasien. (<https://genome.ucsc.edu>)



Gambar 8. Lokasi SNP rs9399137 pada Kromosom 6 Region 6q23.3
(Sumber: <https://genome.ucsc.edu>)



Gambar 9. Lokasi SNP rs72872548 pada Kromosom 11(p15.4)
(Sumber: <https://genome.ucsc.edu>)

3) Diskriminasi Alel menggunakan *Real-time* PCR

Diskriminasi alel mengukur fluoresen pada akhir PCR untuk menentukan mutasi yang terjadi. Dengan tehnik ini, primer *forward* dan *reverse* mencakup area yang diinginkan digunakan serta probe hidrolisis. Metode ini memiliki output yang lebih tinggi dibandingkan RFLP karena hasilnya dihasilkan tepat setelah amplifikasi berakhir, tanpa pemrosesan lebih lanjut. Limitasi metode ini biaya yang tinggi

untuk probe dan kebutuhan untuk mesin real-time PCR (Hernaningsih *et al.*, 2022).

4) Sekuensing DNA

Mutasi dapat diidentifikasi dengan mengurutkan produk PCR, biasanya menggunakan metode penghentian dideoksi Sanger. Metode ini membutuhkan produksi untai DNA tunggal sebagai cetakan. Metode ini memungkinkan identifikasi mutasi baru atau langka yang ada dalam populasi (Lin *et al.*, 2020). Teknologi NGS memiliki kemampuan untuk melakukan sekuens seluruh genom dengan output yang sangat tinggi yang tidak dapat dilakukan menggunakan metode Sanger (Lin *et al.*, 2020). *Sequencing* adalah metode deteksi yang paling mahal dibandingkan dua pemeriksaan sebelumnya, namun memberikan hasil yang paling komprehensif untuk gen beta globin (Panigrahy *et al.*, 2016).

i. Alur Diagnosis Thalassemia

Alur pemeriksaan thalassemia dimulai dari tahap anamnesis dan pemeriksaan fisik. Pada anamnesis, dikaji keluhan seperti pucat kronis, mata kuning, perut membuncit, keterlambatan tumbuh kembang, serta riwayat keluarga thalassemia dan transfusi darah berulang. Pemeriksaan fisik kemudian dilakukan untuk mengidentifikasi tanda klinis seperti anemia, ikterus, *facies Cooley*, hepatosplenomegali, gangguan status gizi, perawakan pendek, hiperpigmentasi kulit, dan keterlambatan pubertas. Temuan klinis ini menjadi dasar untuk melanjutkan ke pemeriksaan penunjang laboratorium.

Pemeriksaan laboratorium diawali dengan pemeriksaan darah tepi lengkap yang meliputi kadar hemoglobin, indeks eritrosit, retikulosit, serta evaluasi morfologi eritrosit pada apus darah tepi. Jika hasil mengarah pada dugaan thalassemia, pemeriksaan dilanjutkan dengan analisis hemoglobin menggunakan elektroforesis atau metode HPLC. Pemeriksaan ini dilakukan untuk menilai fraksi hemoglobin secara kualitatif dan kuantitatif.

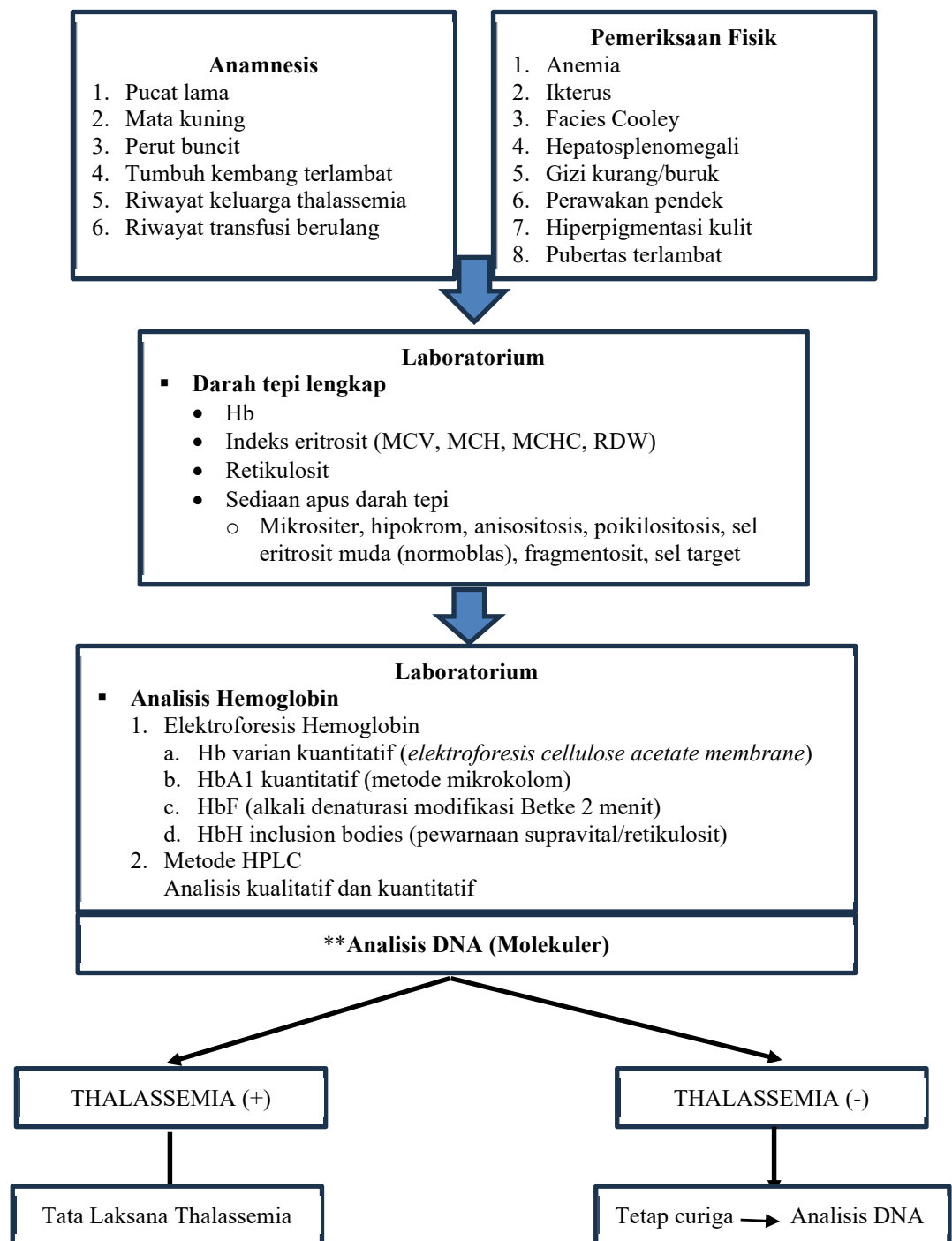
Konfirmasi diagnosis selanjutnya ditegakan melalui analisis DNA untuk mengidentifikasi kelainan genetik. Berdasarkan hasil tersebut, pasien dengan thalassemia positif akan mendapatkan tata laksana sesuai kebutuhan, sedangkan pada hasil negatif dengan kecurigaan klinis yang masih kuat, tetap dipertimbangkan untuk dilakukan pemeriksaan molekuler lanjutan.

Pada kondisi tertentu, terutama pada pasien yang telah menjalani transfusi darah, evaluasi lanjutan dapat dilakukan dengan pemeriksaan tambahan serta analisis hemoglobin pada kedua orang tua. Pemeriksaan DNA menjadi semakin penting apabila pasien telah mendapatkan transfusi berulang, hasil skrining orang tua menunjukkan pembawa sifat thalassemia, atau hasil pemeriksaan esensial tidak khas sehingga menimbulkan kecurigaan terhadap thalassemia, termasuk kemungkinan thalassemia alfa dengan delesi satu gen atau mutasi titik (Olivieri et al., 2010).

Tabel 1. Manifestasi Klinis

RINGKASAN THALASSEMIA: GAMBARAN SEL DARAH MERAH, MANIFESTASI KLINIS & ANALISIS HEMOGLOBIN

THALASSEMIA	GAMBARAN SEL DARAH MERAH	MANIFESTASI KLINIS	ANALISIS HEMOGLOBIN
ALFA-THALASSEMIA			
Delesi 1 gen (-α/αα)	Normal	Normal	Hb Bart's 1-2%
Delesi 2 gen (α-thalassemia trait) (-αα/αα)	Mikrositik, hipokromik ringan	Normal Anemia ringan	Hb Bart's 5-10%
Delesi 3 gen (HbH) (-ααα/αα)	Mikrositik, hipokromik	Anemia ringan, transfusi tidak diperlukan/transfusional intermiten	HbH: 10-15%
Delesi 4 gen (Hb Barts hydrops fetalis) (-αααα/αααα)	Anisositosis, poikilositosis	Hidrops fetalis Distal intertarsal atau neonatal	Hb Barts: 80-90%
BETA-THALASSEMIA			
Thalassemia trait (β-thalassemia minor)	Mikrositik, anemia ringan	Normal	HbA ₂ ↑, HbF bervariasi, penurunan ringan HbA
Thalassemia intermedia (non-transfusion-dependent)	Hipokromik, anisositosis	Anemia ringan-sedang, memerlukan transfusi intermiten	HbA ₂ 3-6%, HbF 10-30%, HbA tidak boleh kurang dari 20%
Thalassemia mayor (transfusion-dependent)	Mikrositik, sel darah merah band	Transfusi-dependent	HbA ₂ > 6%, HbF > 2%, HbA 0% atau sangat rendah
Keterangan: Hb Bart's = Hemoglobin Bart's (γ ₄); HbH = Hemoglobin H (β ₃ γ); HbA = α ₂ β ₂ ; HbA ₂ = α ₂ β ₂ ; HbF = α ₂ γ ₂			



Gambar 10. Alur Diagnosis Thalassemia (Sumber: Kemenkes RI, 2018)

B. Beta-Thalassemia di Indonesia

Berbagai penelitian di Indonesia menunjukkan keragaman mutasi gen β -globin pada pasien β -thalassemia. Studi yang dilakukan di beberapa provinsi, seperti Sulawesi, Jawa, dan Sumatera pada tahun 1998, menemukan bahwa mutasi yang paling sering adalah HbE (29%), diikuti oleh IVS1-nt5 (19%) dan Cd 35 (8%), sementara mutasi lainnya memiliki frekuensi lebih rendah, yaitu berkisar antara 4% hingga kurang dari 1%. Selain itu, pada kelompok delesi gen, yang paling sering ditemukan adalah delesi β -Filipina dan Hb Lepore. Identifikasi mutasi tersebut dilakukan menggunakan metode ARMS (*Amplification Refractory Mutation System*) dan ACRS (*Artificially-Created Restriction Site*). Secara umum, mutasi β -thalassemia yang telah teridentifikasi di Indonesia mencakup beberapa jenis utama, antara lain IVS1-nt5 (G>C), IVS1-nt1 (G>T), Cd 8-9 (+G), Cd 15 (TGG>TAG), Cd 41-42 (del CTTT), IVS-nt654 (C>T), serta HbE (Cd 26, GAG>AAG) (Fucharoen *et al.*, 2012).

Penelitian di tingkat regional menunjukkan variasi distribusi mutasi. Studi oleh Handayani di Daerah Istimewa Yogyakarta pada pasien suspek karier β -thalassemia, menggunakan metode PCR-RFLP, ARMS, dan *DNA sequencing*, menunjukkan bahwa mutasi yang paling dominan adalah IVS1-5 (G>C) sebesar 71,4%, diikuti IVS1-2 (T>C) sebesar 7,1% dan IVS1-1 (G>T) sebesar 3,6%. Selain itu, ditemukan mutasi *frameshift* seperti Cd 35 (-C) sebesar 10,7% dan Cd 8/9 (+G) sebesar 3,6%, serta mutasi *missense* Cd 6 (GAG>GTG) (Petrou, 2010).

Pada populasi suku Jawa di wilayah Banyumas, Jawa Tengah bagian selatan, analisis molekuler menggunakan PCR-RFLP, ARMS, dan *direct sequencing* mengidentifikasi 14 jenis alel mutasi. Mutasi yang paling sering adalah IVS1-5 (G>C) sebesar 43,5%, diikuti Cd 26 (HbE) sebesar 28,2%. Mutasi lainnya meliputi IVS1-1 (G>A), Cd 15 (TGG>TAG), IVS1-1 (G>T), dan Cd 35 (-C), serta sejumlah mutasi lain dengan frekuensi masing-masing sekitar 1% (Lin *et al.*, 2020).

Sementara itu, studi di Kalimantan Timur menunjukkan bahwa mutasi HbE (Cd 26, GAG>AAG) merupakan mutasi yang paling dominan dengan frekuensi 48,4%, diikuti oleh IVS1-5 (G>C) sebesar 14,5% dan IVS1-2 (T>C) sebesar 12,9%. Mutasi lainnya yang ditemukan antara lain Cd 35 (-C), IVS1-1 (G>T),

Cd 30 (AGG>ACG), dan Cd 60 (GTG>GAG) dengan frekuensi yang lebih rendah (Susanto *et al.*, 2019; Lin *et al.*, 2020).

C. Pengaruh Suku dalam Keparahan Penyakit

Keparahan suatu penyakit, termasuk β -thalassemia, tidak secara langsung ditentukan oleh suku atau etnis tertentu. Namun, faktor yang berkaitan dengan etnis, seperti variasi genetik, pola makan, gaya hidup, serta lingkungan, dapat memengaruhi manifestasi klinis dan derajat keparahan penyakit. Berdasarkan penelitian Munkongdee *et al.* (2021), terdapat variasi derajat keparahan β -thalassemia antar populasi yang diduga berkaitan dengan perbedaan frekuensi alel serta *linkage disequilibrium* pada masing-masing kelompok etnis. Variasi genetik ini berkontribusi terhadap perbedaan ekspresi klinis penyakit. Selain faktor genetik, aspek lingkungan dan pola konsumsi juga dapat berperan sebagai faktor modifikasi. Sebagai contoh, pola makan yang tinggi zat besi pada suku tertentu, dapat memperburuk kondisi kelebihan zat besi pada pasien β -thalassemia, terutama pada individu yang menjalani transfusi rutin. Oleh karena itu, pengaturan asupan zat besi dan gula menjadi bagian penting dalam manajemen penyakit (Soliman *et al.*, 2023).

III. METODE PENELITIAN

A. Jenis dan Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan observasi laboratorik dengan desain *cross sectional* karena bertujuan untuk mengidentifikasi spesifisitas dan sensitivitas hasil pemeriksaan kombinasi SNP rs9399137, rs72872548 dengan PS-Exposed RBCs berbasis ELISA terhadap tingkat keparahan pasien beta-thalassemia. Pemeriksaan *Phosphatidylserine* (PS) pada penelitian ini adalah metode ELISA untuk menentukan jumlah dan level ekspresi *phosphatidylserine* pada sel darah merah (*PS-Expose RBCs*) dan metode pendekatan molekuler untuk melihat perubahan susunan nukleotida tunggal penderita beta-thalassemia.

B. Waktu dan Tempat Penelitian

1. Tempat Penelitian

Penelitian ini akan dilaksanakan di beberapa tempat, antara lain: RSUD Dr. H. Abdul Moeloek Provinsi Lampung untuk pengambilan sampel darah. Pemeriksaan *Complete Blood Count* (CBC) dan analisis Hb dilakukan di Laboratorium Patologi Klinik RSUD Dr. H. Abdul Moeloek Provinsi Lampung. Pemeriksaan *phosphatidylserine* metode ELISA dilaksanakan di Laboratorium Biologi Molekuler, Biologi Medik dan Fisiologi Fakultas Kedokteran Universitas Lampung. Ekstraksi DNA, proses PCR dan pemeriksaan SNP dilakukan di Laboratorium pengujian molekuler INALAB DNA.

2. Waktu penelitian

Penelitian dimulai dari bulan September 2024 sampai dengan bulan November 2025.

C. Populasi dan Sampel

Populasi dalam penelitian ini adalah semua pasien terdiagnosis beta-thalassemia mayor yang menjalani pengobatan di ruangan rawat thalasemia Alamanda RSUD Dr. H. Abdul Moeloek provinsi Lampung. Sampel yang digunakan adalah seluruh pasien yang terdiagnosis beta-thalassemia mayor yang memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi.

Adapun kriteria inklusi yang digunakan adalah penderita yang terdiagnosis beta-thalassemia mayor berdasarkan pemeriksaan elektroforesis Hb, usia 0-18 tahun dan menjalani perawatan di ruang rawat Alamanda, menjalankan kontrol secara rutin, memiliki data klinis lengkap, bersedia diambil darah perifer sebanyak 3 cc untuk pemeriksaan SNP dan PS, serta bersedia terlibat dalam penelitian yang dibuktikan dengan menandatangani lembar persetujuan penelitian. Sementara itu, kriteria eksklusi yang digunakan adalah penderita beta-thalassemia yang sedang infeksi akut atau demam saat pengambilan sampel darah perifer, menderita penyakit hematologi lainnya seperti keganasan leukemia, anemia lain dan MDS, menderita penyakit kronis seperti gagal ginjal terminal, penyakit hati berat dan keganasan, sampel darah yang diambil lisis, data medis tidak lengkap, penderita beta-thalassemia yang tidak kooperatif dan menolak terlibat dalam penelitian. Pada penelitian, peneliti menggunakan teknik pengambilan sampel *consecutive sampling*. Semua penderita beta-thalassemia yang memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi dimasukkan sebagai sampel penelitian. Pada akhirnya, terdapat 32 orang pasien beta-thalassemia yang memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi yang dilibatkan sebagai sampel penelitian.

D. Persetujuan Etik

Penelitian ini melibatkan manusia sebagai subjek dan harus mendapatkan persetujuan dari komite etik penelitian untuk dapat dilaksanakan. Sebelum penelitian ini dimulai, protokol penelitian ini telah diajukan ke komisi etik penelitian untuk diuji dan ditelaah. Subjek penelitian diberikan penjelasan mengenai penelitian kemudian dimintai persetujuan untuk menjadi subjek penelitian. Penelitian ini sudah mendapatkan persetujuan etik dari Komite Etik Penelitian Kesehatan Rumah Sakit Umum Daerah Dr. H. Abdul Moeloek Bandar Lampung, dengan Nomor Persetujuan: 411/KEPK-RSUDAM/I/2025.

E. Klasifikasi Variabel dan Definisi Operasional

1. Variabel Bebas dan Variabel Terikat

Ada dua variabel dalam penelitian ini. Penelitian ini menggunakan SNP kode SNP: rs9399137 dan rs72872548 serta intensitas ekspresi *phosphatidylserine* pada sel darah merah (PS-exposed RBCs) yang menjadi variabel bebas. Pasien beta-thalassemia adalah variabel terikat pada penelitian ini.

2. Definisi Operasional Penelitian

Tabel 2. Definisi Operasional

Variabel	Definisi	Cara Ukur	Alat Ukur	Hasil	Skala
SNP rs9399137	Variasi sekuen nukleotida tunggal. Pada penelitian ini yang diteliti adalah SNP rs9399137	Metode sekuensing konvensional	Perangkat lunak Bioedit dan Crhomaspro	Ada/tidak perubahan susunan nukleotida tunggal pada gen beta-thalassemia yaitu rs9399137	Nominal
SNP rs72872548	Variasi sekuen nukleotida tunggal. Pada penelitian ini yang diteliti adalah SNPrs72872548	Metode sekuensing konvensional	Perangkat lunak Bioedit dan Crhomaspro	Ada/tidak perubahan susunan nukleotida tunggal pada gen beta-thalassemia yaitu rs72872548	Nominal
<i>PS-exposed RBCs</i>	Fosfolipid bermuatan negatif yang umumnya terletak di monolayer bagian dalam membran RBC. Pada thalassemia, membran RBC teroksidasi dan mengekspresikan <i>PS-exposed RBCs</i>	ELISA	ELISA Reader	Kadar PS dalam ng/	Nominal

Tingkat Keparahan Beta- Thalassemia	Mengukur tingkat keparahan dengan cara menilai dari frekuensi transfusi darah pasien beta-thalassemia dan ada tidaknya organomegali	Rekam Medis	Rekam Medis	1= Ringan - Sedang 2= Berat	Rasio
--	---	-------------	-------------	-----------------------------------	-------

F. Alat dan Bahan Penelitian

1. Alat Penelitian

Alat-alat yang digunakan berupa sarung tangan karet, botol semprot, labu *Erlenmeyer*, flask T-25, botol *Duran*, tabung *Eppendorf*, pipet mikro, haemocytometer, timbangan analitik, autoklaf, lemari es, inkubator 37°C/5% CO₂, microbial safety cabinet air flow kelas II, vortex, penangas air, sentrifus, tabung sentrifugal, mikroskop inverted, *ELISA Reader*, *ELISA Washer*, dan 6 well plate, tabung mikro sentrifugasi 1,5 ml steril, penangas air (*water bath*), pipet mikro BIOHIT berbagai ukuran, vortex DADD, 2 mL *collection tube*, sentrifuge, tabung *Eppendorf*, mikrotip biologi ukuran 10, 200, dan 1000, incubator EYELA NDO-400, *biomedical freezer*, elektroforesis ATTO My Power II 300 AE8135, timbangan analitik, *gel doc system*, penggaris sumur, *DNA sequencer APRISM 3730x1 Genetic Analyzer develop by Applied Biosystems, US*.

2. Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan pada penelitian ini diantaranya kit ELISA (Cat. No: ELK8149 *Human Elisa*, ELK Biotechnology), kit ekstraksi DNA darah (*Genomic DNA Mini Kit*, Geneaid Biotech Ltd., Taiwan), Kit PCR *Line Gene Mini S Fluorescent Quantitative Detection System* (Hangzhou Bioer Technology, China), agarosa, ethidium bromide, *loading dye*, *plastic wrap*, primer spesifik SNP rs9399137 dan SNP rs72872548, *RBC lysis buffer*, *GB buffer*, *elution buffer*, ethanol absolut, *W1 buffer*, *wash buffer*.

G. Prosedur Penelitian

1. Pemeriksaan Ekspresi PS menggunakan metode ELISA

Ekspresi PS ditentukan menggunakan kit ELISA komersial yang telah tersedia di pasaran (Cat. No: ELK8149 Human ELISA, ELK Biotechnology). Prosedur pemeriksaan ekspresi PS dilakukan sesuai dengan protokol yang direkomendasikan oleh pabrikan. Protokol kerja pemeriksaan ekspresi PS diringkas sebagai berikut. Sebanyak 50 μ L standar atau sampel dimasukkan ke dalam setiap sumuran yang telah dilabel dengan antibodi anti-PS yang tersedia dalam kit ELISA. Sumuran kemudian diinkubasi bersama 50 μ L larutan kerja *Biotinylated-Conjugate* 1 \times selama 1 jam pada suhu 37 $^{\circ}$ C. Selanjutnya, sumuran dicuci sebanyak tiga kali menggunakan larutan *wash buffer*/WB. Setelah itu, ke dalam sumuran segera ditambahkan 100 μ L larutan *HRP-Streptavidin* dan diinkubasi kembali selama 1 jam pada suhu 37 $^{\circ}$ C. Setelah inkubasi, sumuran dicuci sebanyak lima kali dengan WB. Setelah pencucian, ke dalam sumuran ditambahkan 90 μ L larutan substrat TMB dan diinkubasi pada suhu 37 $^{\circ}$ C selama 20 menit dalam kondisi gelap. Setelah masa inkubasi 20 menit, ditambahkan 50 μ L larutan *Stop Reagent* ke dalam setiap sumuran dan dicampur sampai merata dengan shaker selama 1 menit. Hal ini bertujuan untuk menghentikan reaksi yang terjadi. Setelah itu, sumuran harus segera dibaca pada *microplate reader* dengan panjang gelombang 450 nm. Ekspresi PS pada sel eritrosit kemudian dihitung berdasarkan kurva standar dan dinyatakan dalam satuan ng/mL.

2. Pemeriksaan Polimorfisme Nukleotida Tunggal (SNP)

a. Ekstraksi DNA Darah

Deoxyribonucleic Acid (DNA) darah diekstraksi menggunakan kit ekstraksi *Genomic DNA Mini Kit* (Geneaid Biotech Ltd., Taiwan). Langkah kerja yang dilakukan sebagai berikut. Sampel darah dalam tabung EDTA divortex selama satu menit untuk menghomogenkan darah. Sampel kemudian diambil sebanyak 300 μ L dan dimasukkan ke dalam tabung baru. Selanjutnya, ke dalam tabung tersebut ditambahkan reagen *RBC lysis buffer* sebanyak 900 μ L, dan dicampur agar larutan tersebut homogen tanpa di vortex. Tabung kemudian diinkubasi pada suhu ruang selama 10 menit. Setelah masa inkubasi selesai, tabung kemudian disentrifuse dengan kecepatan 10.000 rpm selama 5 menit.

Selanjutnya, ke dalam tabung tersebut, ditambahkan 200 μ L RBCL, lalu di quick spin, dan ditambahkan 200 μ L GB *buffer* dan dikocok sampai berbusa. Tabung kemudian diinkubasi kembali pada suhu 65 °C selama 10 menit dan dibolak-balik setiap 3 menit.

Setelah masa inkubasi selesai, tabung dibiarkan sampai suhunya sama dengan suhu ruang terlebih dahulu. Selanjutnya, ke dalam tabung tersebut, ditambahkan 200 μ L ethanol absolut dan dikocok kuat selama 10 detik. Setelah itu, larutan dimasukkan ke dalam *GD Column* beserta tabung yang baru. Tabung kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm selama 10 menit. *GD Column* kemudian dipindahkan ke dalam tabung yang baru, sementara cairan yang ada pada tabung yang lama dibuang. Selanjutnya, ke dalam *GD Column* dimasukkan *W1 buffer* sebanyak 400 μ L dan disentrifugasi pada kecepatan 10.000 rpm selama 2 menit. Setelah itu, ke dalam tabung ditambahkan 600 μ L larutan *wash buffer* dan disentrifugasi pada kecepatan 10.000 rpm selama 2 menit. Cairan yang terkumpul di dalam tabung pengumpul kemudian di buang, dan *GD Column* beserta tabung nya disentrifugasi kembali selama 3 menit. Setelah itu, *GD Column* dipindahkan ke dalam tabung lancip dan ditambahkan *elution buffer* yang sebelumnya sudah diinkubasi pada suhu 65°C. Setelah itu, tabung disentrifugasi pada kecepatan 10.000 rpm selama 2 menit. *GD Column* kemudian dibuang, dan larutan hasil ekstraksi diberi label dan disimpan pada suhu -80 °C sampai waktu pengujian.

b. Analisa Kualitas dan Kuantitas Hasil Ekstraksi

Hasil ekstraksi DNA yang telah diperoleh, selanjutnya dianalisis kualitas dan kuantitasnya menggunakan NanoDrop. Sebanyak 1-2 μ L larutan hasil ekstraksi ditempatkan pada pedestal bawah Nano Drop, kemudian dilakukan pembacaan absorbansi pada tiga panjang gelombang, yaitu 230 nm, 260 nm, dan 280 nm. Pembacaan pada panjang gelombang 230 nm bertujuan untuk mendeteksi adanya kontaminan organik atau garam residu. Pembacaan pada panjang gelombang 260 nm bertujuan untuk mendeteksi asam nukleat, sementara pembacaan pada panjang gelombang 280 nm untuk mendeteksi kemungkinan kontaminasi protein.

Konsentrasi DNA dihitung menggunakan nilai absorbansi 260 nm, sedangkan tingkat kemurnian dihitung melalui perbandingan rasio absorbansi pada panjang gelombang 260/280 nm dan 230/260 nm. Hasil ekstraksi DNA dianggap bernilai baik tanpa kontaminasi protein, apabila rasio absorbansi 260/280 nm nya mendekati 1,8 – 2,0. Sementara itu, apabila rasio absorbansi 260/230 nya lebih besar dari 2,0 menandakan rendahnya kontaminasi fenol, karbohidrat, atau residu garam.

c. Amplifikasi dengan Metode PCR

Proses PCR dilakukan menggunakan kit PCR *Line Gene Mini S Fluorescent Quantitative Detection System* (Hangzhou Bioer Technology, China). Hasil ekstraksi DNA yang telah didapatkan, selanjutnya diamplifikasi menggunakan metode PCR. Sebanyak 2 µL DNA hasil ekstraksi, dimasukkan ke dalam tube PCR yang sudah berisi 10,5 µL PCR mastermix, 0,25 µL primer forward, 0,25 µL primer reverse, dan 8 µL buffer TE. Primer SNP rs9399137 yang digunakan adalah primer *Forward: 5'-TGGGGTGGGAGAAGAAATAA-3'* dan *Reverse: 5'-AGAAGCACTTTGGCAAGCAT-3'* (Chen *et al.*, 2021). Sementara itu, primer yang digunakan untuk SNP rs72872548 adalah primer *Forward: 5'-GCCCTGTACTATCTGGTCTT-3'* dan primer *Reverse: 5'-AAGAAGGAGCTGTTAGTGGT-3'*.

Tube PCR kemudian dimasukkan ke dalam PCR lalu diatur program thermocycling yang terdiri dari 6 tahapan, yaitu tahap denaturasi awal (95 °C selama 5 menit), tahap denaturasi (95 °C selama 30 detik), tahap penempelan annealing (56 °C selama 40 detik), tahap elongasi (72 °C selama 40 detik), tahap post elongasi (72 °C selama 5 menit), dan tahap pendinginan (25 °C selama 10 menit). Setelah itu, sampel hasil PCR disimpan pada suhu 4 °C agar DNA tidak rusak.

DNA hasil PCR yang sudah didapat, selanjutnya dielektroforesis untuk mengevaluasi hasil PCR yang telah dikerjakan. Elektroforesis dilakukan menggunakan metode gel agarose. Proses elektroforesis dilakukan selama 25 menit dengan arus listrik 100 volt. Setelah proses elektroforesis selesai, pita-pita DNA yang terbentuk diamati menggunakan sinar UV pada *gel doc*. Jika terdapat amplifikasi, maka akan muncul satu pita tunggal. Berdasarkan sumber primer

yang diambil, primer yang mengamplifikasi SNP rs9399137 dan SNP rs72872548, akan menghasilkan pita tunggal DNA dengan kisaran ukuran berturut-turut sebesar 300 bp dan 600-700 bp.

d. Sekuensing Hasil PCR

Setelah dipastikan sampel mengandung template DNA yang diharapkan, yaitu SNP rs9399137 dan SNP rs72872548, selanjutnya sampel akan dilakukan sekuensing menggunakan metode Sanger. Sebanyak 45 μ L hasil PCR dipindahkan ke PCR *tube* yang baru, dikemas dengan rapi, kemudian dimasukkan ke dalam kotak pendingin yang berisi es kering. Sampel diantar langsung ke penyedia jasa sekuensing, yaitu PT. Genetika Science. Hasil sekuensing yang di dapat berupa elektroforegram, yang selanjutnya dianalisis menggunakan perangkat lunak BioEdit untuk mendapatkan data alel yang ada pada kedua SNP.

H. Analisa Data

1. Analisa Data Hasil Sekuensing

Hasil sekuensing adalah elektroferogram. Pada penelitian ini ada tiga jenis elektroferogram yang dihasilkan dari sekuensing menggunakan dua pasang primer yaitu primer yang melekat pada region sekitar SNP rs9399137 dan rs7287254. Tahap pertama analisis adalah dengan melakukan *alignment*, dimana elektroferogram kemudian di sejajarkan dengan bank data gen. Proses ini menggunakan perangkat lunak BioEdit dan Chromaspro. *Alignment* bertujuan untuk mengetahui posisi SNP pada amplicon hasil sekuensing. Hasil *alignment* berupa letak SNP yang diteliti. Analisis SNP dilakukan pada sisi SNP rs9399137 dan rs72872548 dengan perangkat lunak bioedit dan chromaspro baik di sekuen forward maupun reverse. Pada analisis elektroferogram menggunakan *software* bioedit, urutan basa nitrogen diwakili oleh gelombang berpuncak dengan berbagai warna. Basa C berwarna kuning, basa G berwarna putih, basa T berwarna hijau, basa A berwarna merah muda. Umumnya satu posisi hanya memiliki satu basa nitrogen, namun pada satu posisi SNP dapat terjadi 2 peak elektroferogram, misalnya basa C dan T. Ini menunjukkan site tersebut merupakan genotip heterozigot CT.



Gambar 11. Alur Kerja Pemeriksaan SNP (Sumber: Kit PT. Genetica Science, 2025)

2. Analisa Data Hasil Penelitian

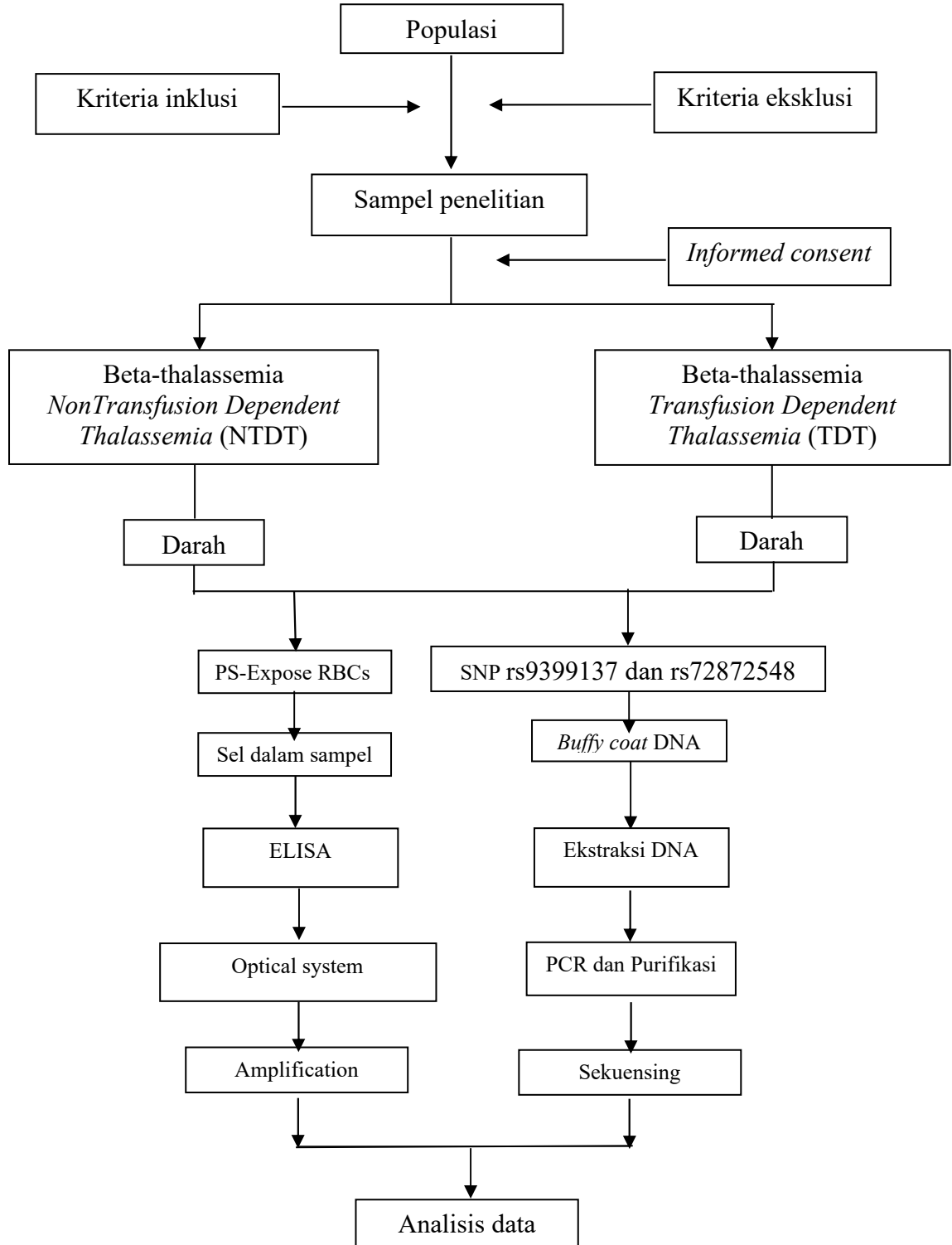
Data hasil penelitian yang sudah didapatkan selanjutnya, akan dilakukan uji univariat, uji bivariat, dan uji multivariat. Pengujian data yang dilakukan sebagai berikut:

- Analisis univariat digunakan untuk mengetahui variasi genotipe pada SNP rs9399137 dan rs72872548 pada beta-thalassemia.

- b. Analisis bivariat menggunakan uji *Fisher Exact* digunakan untuk menganalisis hubungan antara SNP rs9399137 dan SNP rs72872548 dengan tingkat keparahan pasien beta-thalassemia.
- c. Analisis statistik bivariat *Mann Whitney* digunakan untuk menganalisis perbedaan ekspresi PS pada pasien beta-thalassemia berat dengan pasien beta-thalassemia ringan-sedang.
- d. Analisis statistik bivariat uji T tidak berpasangan digunakan untuk menganalisis perbedaan nilai parameter hematologi berdasarkan variasi genotipe pada SNP rs9399137 dan rs72872548.
- e. Analisis *Receiver Operating Characteristic (ROC)* digunakan untuk menilai kemampuan diskriminasi SNP rs9399137, rs72872548 dan ekspresi PS dalam membedakan pasien beta-thalassemia berat dengan keparahan ringan-sedang, serta sensitivitas dan spesifisitas optimal.
- f. Analisis sensitivitas dan spesifisitas dilakukan menggunakan tabel kontingensi 2x2 dan analisis ROC.
- g. Analisis Regresi Logistik Multivariat digunakan untuk menilai model kombinasi SNP rs9399137, SNP rs72872548 dan PS dalam memprediksi tingkat keparahan beta-thalassemia.

I. Alur Penelitian

Penelitian ini dilakukan mengikuti langkah-langkah seperti pada gambar berikut ini:



Gambar 12. Alur Penelitian

V. SIMPULAN DAN SARAN

A. Simpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan, maka dapat diambil Kesimpulan sebagai berikut:

1. Pada SNP rs9399137, genotipe TT merupakan genotipe yang paling banyak ditemukan (66,7%), diikuti oleh CT (18,5%) dan CC (14,8%). Distribusi alel dengan frekuensi paling banyak alel T (75,9%) dan alel C (24,1%).
2. Pada SNP rs72872548, genotipe CC merupakan genotipe yang paling banyak ditemukan (82,1%), diikuti oleh AA (10,7%) dan TT (7,1%). Distribusi alel dengan frekuensi paling banyak alel C (82,1%), diikuti A (10,7%) dan T (7,1%).
3. Variasi genotipe pada SNP rs9399137 sebagai prediktor tingkat keparahan pasien beta-thalassemia, memiliki sensitivitas sebesar 92,30%, spesifisitas sebesar 57,14%, dengan nilai PPV, NPV, LR+ dan LR- berturut-turut sebesar 66,67%, 2,15 dan 0,13.
4. Variasi genotipe pada SNP rs72872548 sebagai prediktor tingkat keparahan pasien beta-thalassemia, memiliki sensitivitas sebesar 92,86%, spesifisitas sebesar 28,57%, dengan nilai PPV, NPV, LR+ dan LR- berturut-turut sebesar 56,52%, 80%, 1,3 dan 0,25.
5. Ekspresi PS sebagai prediktor tingkat keparahan pasien beta-thalassemia, memiliki sensitivitas sebesar 64,71% dan spesifisitas sebesar 86,67%, dengan nilai PPV, NPV, LR+ dan LR- berturut-turut sebesar 84,61%, 68,42%, 4,85 dan 0,41.
6. Model kombinasi SNP rs9399137 dan ekspresi PS sebagai prediktor tingkat keparahan memiliki AUC sebesar 0,843 (95% CI: 0,689–0,998) dengan sensitivitas 92,3% dan spesifisitas 57,1%. Model kombinasi SNP rs

72872548 dan ekspresi PS sebagai prediktor tingkat keparahan memiliki AUC sebesar 0,747 (95% CI: 0,559 – 0,936) dengan sensitivitas 64,3% dan spesifisitas 85,7%. Model kombinasi SNP rs9399137 dan SNP rs72872548 sebagai prediktor tingkat keparahan memiliki AUC sebesar 0,783 (95% CI: 0,603 – 0,963) dengan sensitivitas 92,3% dan spesifisitas 55,9%. Model kombinasi SNP rs9399137, SNP rs72872548 dan ekspresi PS sebagai prediktor tingkat keparahan memiliki AUC sebesar 0,852 (95% CI: 0,701 – 0,974) dengan sensitivitas 84,6% dan spesifisitas 71,4%.

7. Model kombinasi gabungan SNP rs9399137, SNP rs72872548 dan PS sebagai prediktor tingkat keparahan memiliki sensitivitas (84,6%) dan spesifisitas (71,4%) yang paling optimal dengan nilai diskriminasi yang paling baik (AUC=0,852; 95% CI: 0,701–0,974).

B. Saran

Setelah dilakukan penelitian, ada beberapa saran yang dapat disampaikan untuk penelitian selanjutnya, yaitu:

1. Perlu dilakukan penelitian lanjutan dengan ukuran sampel yang lebih besar dan representatif, serta melibatkan desain multi senter untuk memvalidasi model prediksi hasil penelitian ini. Hal ini perlu dilakukan agar hasilnya dapat digeneralisasi pada populasi yang lebih besar.
2. Perlu dikembangkan model prediksi yang lebih komprehensif dengan menambahkan modifier genetik lain, seperti BCL11A dan berbagai varian regulator eritopoiesis lain, yang telah diketahui berperan dalam keparahan beta-thalassemia.
3. Perlu mempertimbangkan pengukuran PS menggunakan metode yang lebih spesifik, seperti flowcytometri.
4. Perlu dilakukan penelitian dengan desain longitudinal untuk mengevaluasi perubahan PS dan marker prediktor lain untuk menilai hubungan temporal dan kausal antara kerentanan genetik, kerusakan eritrosit dan progresi keparahan penyakit, yang tidak dapat dijelaskan sepenuhnya dengan desain *cross sectional*.

DAFTAR PUSTAKA

- Abbas, S., Khan, H. A., Rehman, W., Shah, M. M., Mustafa, M., & Abbas, M. (2024). Cardiovascular effects of splenomegaly and splenectomy in beta-thalassemia major. *Cureus*, *16*(11), e74186. <https://doi.org/10.7759/cureus.74186>
- Adeyeye, O. A., & Salawu, L. (2022). Multiple blood transfusion may contribute to abnormal liver and endocrine functions in adults with sickle cell anaemia. *West African Journal of Medicine*, *39*(1), 39–44.
- Al-Allawi, N., Qadir, S. M. A., Puehringer, H., Chui, D. H. K., Farrell, J. J., & Oberkanins, C. (2019). The association of HBG2, BCL11A, and HMIP polymorphisms with fetal hemoglobin and clinical phenotype in Iraqi Kurds with sickle cell disease. *International Journal of Laboratory Hematology*, *41*(1), 87–93. <https://doi.org/10.1111/ijlh.12927>
- Al-Shawia, M. A., Abdullah, Q.Y. (2022). Seroprevalence of hepatitis B virus among multi-transfused beta thalassemia patients attending at the yemeni society for thalassemia - Sana'a, Yemen. *Electronic Journal of University of Aden for Basic and Applied Sciences*, *3*(3), 158–162. <https://doi.org/10.47372/ejua-ba.2022.3.181>
- Amelia, M., Gurnida, D.A., Reniarti, L. (2014). Hubungan kadar ferritin dan ion kalsium serum pada penyandang thalassemia mayor anak yang mendapat transfusi berulang. *Sari Pediatri*, *16*(1):1–4. <http://dx.doi.org/10.14238/sp16.1.2014.1-4>
- Angastiniotis, M., & Lobitz, S. (2019). Thalassemias: An overview. *International Journal of Neonatal Screening*, *5*(1), 16. <https://doi.org/10.3390/ijns5010016>
- Arioua, A., & Shaw, D. (2024). The burden of thalassemia disorder: Past and present: The feedback of patients experience in the COVID-19 pandemic crisis. *Asian Journal of Transfusion Science*, *19*(1), 125–129. https://doi.org/10.4103/ajts.ajts_123_23
- Asadov, C., Alimirzoeva, Z., Mammadova, T., Aliyeva, G., Gafarova, S., & Mammadov, J. (2018). β -Thalassemia intermedia: A comprehensive overview and novel approaches. *International Journal of Hematology*, *108*(1), 5–21. <https://doi.org/10.1007/s12185-018-2411-9>
- Atmakusuma, T.D., Saragih, E.Y.P., Rajabto, W. (2021). Achievement of pre- and post-transfusion hemoglobin levels in adult transfusion-dependent beta thalassemia: Associated factors and relationship to reduction of spleen enlargement. *Int J Gen Med*, *14*, 7515-7521. <https://doi.org/10.2147/IJGM.S338114>

- Azman, N. F., Abdullah, W. Z., Hanafi, S., Diana, R., Bahar, R., Johan, M. F., Zilfalil, B. A., & Hassan, R. (2020). Genetic polymorphisms of HbE/beta-thalassemia related to clinical presentation: Implications for clinical diversity. *Annals of Hematology*, *99*(4), 729–735. <https://doi.org/10.1007/s00277-020-03927-5>
- Badens, C., Joly, P., Agouti, I., Thuret, I., Gonnet, K., Fattoum, S., Francina, A., Simeoni, M. C., Loundou, A., & Pissard, S. (2011). Variants in genetic modifiers of β -thalassemia can help to predict the major or intermedia type of the disease. *Haematologica*, *96*(11), 1712–1714. <https://doi.org/10.3324/haematol.2011.046748>
- Bajwa, H., & Basit, H. (2023). Thalassemia. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. Tersedia dari: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK545151/>
- Bakr, A., Al-Tonbary, Y., Osman, G., & El-Ashry, R. (2014). Renal complications of beta-thalassemia major in children. *American Journal of Blood Research*, *4*(1), 1–6.
- Baron, M. H. (2013). Concise review: Early embryonic erythropoiesis: Not so primitive after all. *Stem Cells*, *31*(5), 849–856. <https://doi.org/10.1002/stem.1342>
- Basu, S., Rahaman, M., Dolai, T. K., Shukla, P. C., & Chakravorty, N. (2023). Understanding the intricacies of iron overload associated with β -thalassemia: A comprehensive review. *Thalassemia Reports*, *13*(3), 179–194. <https://doi.org/10.3390/thalassrep13030017>
- Bashir, K., Niazi, U. K., Shahzadi, R., Azam, K., Idrees, A., Ain, Q. U., & Alamin, A. A. (2024). Associations between BCL11A and HBS1L-MYB polymorphisms and thalassemia risk. *Journal of Taibah University Medical Sciences*, *19*(5), 1039–1048. <https://doi.org/10.1016/j.jtumed.2024.10.004>
- Bauer, D. E., Kamran, S. C., & Orkin, S. H. (2012). Reawakening fetal hemoglobin: Prospects for new therapies for the β -globin disorders. *Blood*, *120*(15), 2945–2953. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-06-292078>
- Benites, B. D., Cisneiros, I. S., Bastos, S. O., Lino, A. P. B. L., Costa, F. F., Gilli, S. C. O., & Saad, S. T. O. (2019). Echocardiographic abnormalities in patients with sickle cell/ β -thalassemia do not depend on the β -thalassemia phenotype. *Hematology, Transfusion and Cell Therapy*, *41*(2), 158–163. <https://doi.org/10.1016/j.htct.2018.09.003>
- Bibi, M., Malik, S. N., Afridi, A., Rehman, Z., Ul Abedien, Z., & Khatkhat, A. A. (2023). Incidence of beta-thalassemia minor among healthy blood donors. *Pakistan Journal of Medical & Health Sciences*, *17*(1), 746–748. <https://doi.org/10.53350/pjmhs2023171746>
- Bieker, J. J., & Philipsen, S. (2024). Erythroid Krüppel-like factor (KLF1): A surprisingly versatile regulator of erythroid differentiation. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, *1459*, 217–242. https://doi.org/10.1007/978-3-031-62731-6_10
- Blais, J., Lavoie, S. B., Giroux, S., Bussi eres, J., Lindsay, C., Dionne, J., Laroche, M., Gigu ere, Y., & Rousseau, F. (2015). Risk of misdiagnosis due to allele dropout and false-positive PCR artifacts in molecular diagnostics: Analysis of 30,769 genotypes. *The Journal of Molecular Diagnostics*, *17*(5), 505–514. <https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2015.04.004>

- Brancaleoni, V., Di Piero, E., Motta, I., & Cappellini, M.D. (2016). Laboratory diagnosis of thalassemia. *International Journal of Laboratory Hematology*, 38(S1), 32–40. <https://doi.org/10.1111/ijlh.12527>
- Cai, D., Chan, Y., He, G., Kong, Y., Cai, A., Guo, Y., & Zhu, B. (2025). Total ginsenosides enhance γ -globin expression and fetal hemoglobin production in β -thalassemia models. *Frontiers in Pharmacology*, 16, 1578237. <https://doi.org/10.3389/fphar.2025.1578237>
- Calianese, D. C., & Birge, R. B. (2020). Biology of phosphatidylserine (PS): Basic physiology and implications in immunology, infectious disease, and cancer. *Cell Communication and Signaling*, 18(1), 41. <https://doi.org/10.1186/s12964-020-00543-8>
- Cao, A., & Galanello, R. (2010). Beta-thalassemia. *Genet Med*, 12(2), 61–76. <https://doi.org/10.1097/GIM.0b013e3181cd68ed>
- Casu, C., Presti, V. L., Oikonomidou, P. R., Melchiori, L., Abdulmalik, O., Ramos, P., & Rivella, S. (2018). Short-term administration of JAK2 inhibitors reduces splenomegaly in mouse models of β -thalassemia intermedia and major. *Haematologica*, 103(2), e46–e49. <https://doi.org/10.3324/haematol.2017.181511>
- Caria, C. A., Faà, V., & Ristaldi, M. S. (2022). Krüppel-like factor 1: A pivotal gene regulator in erythropoiesis. *Cells*, 11(19), 3069. <https://doi.org/10.3390/cells11193069>
- Cappellini, M. D., Cohen, A., Porter, J., Taher, A. (2014). Genetic basis, pathophysiology and diagnosis of thalassemia. In *Guideline for the management of transfusion dependent thalassemia* (pp. 186–190).
- Chansai, S., Yamsri, S., Fucharoen, S., Fucharoen, G., & Teawtrakul, N. (2022). Phosphatidylserine-exposed red blood cells and ineffective erythropoiesis biomarkers in patients with thalassemia. *American Journal of Translational Research*, 14(7), 4743–4756.
- Chauhan, N. S. (2021). Assessment of thyroid dysfunction in beta thalassemia patients. *International Journal of Advanced Research in Medicine*, 3(1), 272–274. <https://doi.org/10.22271/27069567.2021.v3.i1.e.150>
- Chen, J. M., Zhu, W. J., Liu, J., Wang, G. Z., Chen, X. Q., Tan, Y., Xu, W. W., Qu, L. W., Li, J. Y., Yang, H. J., Huang, L., Cai, N., Wang, W. D., Huang, K., Xu, J. Q., Li, G. H., He, S., Luo, T. Y., Huang, Y., Liu, S. H., ... Zhou, G. B. (2021). Safety and efficacy of thalidomide in patients with transfusion-dependent β -thalassemia: a randomized clinical trial. *Signal transduction and targeted therapy*, 6(1), 405. <https://doi.org/10.1038/s41392-021-00811-0>
- Chernak, B. J., & Rampal, R. K. (2021). Extramedullary hematopoiesis in myeloproliferative neoplasms: Pathophysiology and treatment strategies. *International Review of Cell and Molecular Biology*, 365, 97–116. <https://doi.org/10.1016/bs.ircmb.2021.07.002>
- Chowdhuri, L., & Mahajan, A. (2025). Gender bias in healthcare seeking behavior in patients with transfusion-dependent thalassemia. *Indian Journal of Pediatrics*, 92(4), 453. <https://doi.org/10.1007/s12098-025-05449-2>
- Chumchuen, S., Sripichai, O., Jearawiriyapaisarn, N., Fucharoen, S., & Peerapittayamongkol, C. (2023). Induction of fetal hemoglobin: Lentiviral shRNA knockdown of HBS1L in β 0-thalassemia/HbE erythroid cells. *PLOS*

- ONE*, 18(3), e0281059. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0281059>
- Cromer, M. K., Camarena, J., Martin, R. M., Lesch, B. J., Vakulskas, C. A., Bode, N. M., Kurgan, G., Collingwood, M. A., Rettig, G. R., Behlke, M. A., Lemgart, V. T., Zhang, Y., Goyal, A., Zhao, F., Ponce, E., Srifa, W., Bak, R. O., Uchida, N., Majeti, R., ... Porteus, M. H. (2021). Gene replacement of α -globin with β -globin restores hemoglobin balance in β -thalassemia-derived hematopoietic stem and progenitor cells. *Nature Medicine*, 27(4), 677–687. <https://doi.org/10.1038/s41591-021-01284-y>
- Danjou, F., Francavilla, M., Anni, F., Satta, S., Demartis, F. R., Perseu, L., Manca, M., Sollaino, M. C., Manunza, L., Mereu, E., Marceddu, G., Pissard, S., Joly, P., Thuret, I., Origa, R., Borg, J., Forni, G. L., Piga, A., Lai, M. E., Badens, C., ... Galanello, R. (2015). A genetic score for the prediction of beta-thalassemia severity. *Haematologica*, 100(4), 452–457. <https://doi.org/10.3324/haematol.2014.113886>
- Danjou, F., Anni, F., & Galanello, R. (2011). Beta-thalassemia: From genotype to phenotype. *Haematologica*, 96(11), 1573–1575. <https://doi.org/10.3324/haematol.2011.055962>
- Datar, S., Poflee, S., & Shrikhande, A. (2015). Premarital screening of college students for carrier detection in thalassemia and sickle cell disease: need of the hour. *International Journal of Medical Science and Public Health*, 4(3), 420–423. <https://doi.org/10.5455/ijmsph.2015.1812201469>
- Danjou, F., Anni, F., Perseu, L., Satta, S., Dessi, C., Lai, M. E., Fortina, P., Devoto, M., & Galanello, R. (2012). Genetic modifiers of β -thalassemia and clinical severity as assessed by age at first transfusion. *Haematologica*, 97(7), 989–993. <https://doi.org/10.3324/haematol.2011.053504>
- Davis, C., Ge, J., King, J., Malik, N., Weirich, V., Eisenberg, A. J., & Budowle, B. (2012). Variants observed for STR locus SE33: A concordance study. *Forensic Science International: Genetics*, 6(4), 494–497. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2011.12.002>
- De Sarkar, N., Majumder, M., & Roy, B. (2012). Differential haplotype amplification leads to misgenotyping of heterozygote as homozygote when using single nucleotide mismatch primer. *Electrophoresis*, 33(23), 3564–3573. <https://doi.org/10.1002/elps.201200363>
- Denic, S., Aden, B., Nagelkerke, N., & Essa, A. A. (2013). β -Thalassemia in Abu Dhabi: Consanguinity and tribal stratification are major factors explaining the high prevalence of the disease. *Hemoglobin*, 37(4), 351–358. <https://doi.org/10.3109/03630269.2013.790827>
- De Franceschi, L., Bertoldi, M., Matte, A., Santos Franco, S., Pantaleo, A., Ferru, E., & Turrini, F. (2013). Oxidative stress and β -thalassemic erythroid cells behind the molecular defect. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2013, 985210. <https://doi.org/10.1155/2013/985210>
- Dipta, T. F., Kabir, A. L., Rahman, M. H., Sultana, G. S., Hossain, A. Z., Fatema, N., & Ferdousi, S. (2017). A multicentre based observation of a screening tool to differentiate microcytosis and hypochromia. *Anwer Khan Modern Medical College Journal*, 7(1), 5–10. <https://doi.org/10.3329/akmmcj.v7i1.31600>

- Dorđević, A., Mrakovčić-Sutić, I., Pavlović, S., Ugrin, M., & Roganović, J. (2025). Beta thalassemia syndromes: New insights. *World Journal of Clinical Cases*, *13*(10), 100223. <https://doi.org/10.12998/wjcc.v13.i10.100223>
- Eldor, A., & Rachmilewitz, E. A. (2002). The hypercoagulable state in thalassemia. *Blood*, *99*(1), 36–43. <https://doi.org/10.1182/blood.v99.1.36>
- Emara, M., Turner, A. R., & Allalunis-Turner, J. (2014). Adult, embryonic and fetal hemoglobin are expressed in human glioblastoma cells. *International Journal of Oncology*, *44*(2), 514–520. <https://doi.org/10.3892/ijo.2013.2186>
- Eren, F., Yozgat, A.K., Oguz, E.F., Neselioglu, S., Firat, R., Gokcebay, D.G., Yarali, H.N., Ozbek, N.Y., Erel, O. (2023). A new perspective for potential organ damage due to iron-mediated oxidation in thalassemia major patients. *J Clin Med*, *12*(6), 2422.
- Farid, Y., Bowman, N.S., & Lecat, P. (2023). Biochemistry, hemoglobin synthesis. In: *StatPearls*. StatPearls Publishing. Tersedia dari: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK536912/>
- Farrell, J. J., Sherva, R. M., Chen, Z. Y., Luo, H. Y., Chu, B. F., Ha, S. Y., Li, C. K., Lee, A. C., Li, R. C., Yuen, H. L., So, J. C., Ma, E. S., Chan, L. C., Chan, V., Sebastiani, P., Farrer, L. A., Baldwin, C. T., Steinberg, M. H., & Chui, D. H. (2011). A 3-bp deletion in the HBS1L-MYB intergenic region on chromosome 6q23 is associated with HbF expression. *Blood*, *117*(18), 4935–4945. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-11-317081>
- Ferdous, J., Tasnim, M., Qadri, F., Hosen, M. I., Chowdhury, E. K., & Shekhar, H. U. (2024). Disease-modifying effect of HBS1L-MYB in HbE/β-thalassemia patients in Bangladeshi population. *Thalassemia Reports*, *14*(4), 103–117. <https://doi.org/10.3390/thalassrep14040011>
- Fernandez-Arias, C., Rivera-Correa, J., Gallego-Delgado, J., Rudlaff, R., Fernandez, C., Roussel, C., Götz, A., Gonzalez, S., Mohanty, A., Mohanty, S., Wassmer, S., Buffet, P., Ndour, P. A., & Rodriguez, A. (2016). Anti-self phosphatidylserine antibodies recognize uninfected erythrocytes promoting malarial anemia. *Cell Host & Microbe*, *19*(2), 194–203. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2016.01.009>
- Fibach, E., & Dana, M. (2019). Oxidative stress in β-thalassemia. *Molecular Diagnosis & Therapy*, *23*(2), 245–261. <https://doi.org/10.1007/s40291-018-0373-5>
- Forni, G. L., Gianesin, B., Musallam, K. M., Longo, F., Rosso, R., Lisi, R., Gamberini, M. R., Pinto, V. M., Graziadei, G., Vitucci, A., Bonetti, F., Musto, P., Piga, A., Cappellini, M. D., & Borgna-Pignatti, C. (2023). Overall and complication-free survival in a large cohort of patients with β-thalassemia major followed over 50 years. *American Journal of Hematology*, *98*(3), 381–387. <https://doi.org/10.1002/ajh.26798>
- Fucharoen, S., & Weatherall, D. J. (2012). The hemoglobin E thalassemias. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, *2*(8), a011734. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a011734>
- Galanello, R., & Origa, R. (2010). Beta-thalassemia. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, *5*, 11. <https://doi.org/10.1186/1750-1172-5-11>
- Ghareghani, A., Pirdadi, S., Nikparvar, M., Rafati, S., Bagheri, H., & Ersi, M. H. (2023). The prevalence of pulmonary hypertension in beta-thalassemia patients in Hormozgan Province: A cross-sectional study. *Disease and*

- Diagnosis*, 13(1), 13–17. <https://doi.org/10.34172/ddj.518>
- Graffeo, L., Vitrano, A., Giambona, A., Scondotto, S., Dardanoni, G., Gluud, C., & Maggio, A. (2017). The heterozygote state for β -thalassemia detrimentally affects health outcomes. *American Journal of Hematology*, 92(3), E23–E25. <https://doi.org/10.1002/ajh.24619>
- Gu, Q., Palani, C. D., Smith, A., Li, B., Amos-Abanyie, E. K., Ogu, U., Lu, L., Pace, B. S., & Starlard-Davenport, A. (2022). MicroRNA29B induces fetal hemoglobin via inhibition of the HBG repressor protein MYB in vitro and in humanized sickle cell mice. *Frontiers in Medicine*, 9, 1043686. <https://doi.org/10.3389/fmed.2022.1043686>
- Gurbak, M., Sivasli, E., Coskun, Y., Bozkurt, A. I., & Ergin, A. (2006). Prevalence and hematological characteristics of beta-thalassemia trait in Gaziantep urban area, Turkey. *Pediatric Hematology and Oncology*, 23(5), 419–425. <https://doi.org/10.1080/08880010600683400>
- Hagag, A. A., El-Shanshory, M. R., & Abo El-Enein, A. M. (2015). Parathyroid function in children with beta thalassemia and correlation with iron load. *Advances in Pediatric Research*, 2, 3. <https://doi.org/10.12715/apr.2015.2.3>
- Handayani, N. S. N., Husna, N., Rahmil, G., et al. (2021). Splice-site and frameshift mutations of β -globin gene found in thalassemia carrier screening in Yogyakarta Special Region, Indonesia. *Indonesian Biomedical Journal*, 13, 55–60.
- Hashemizadeh, H., Noori, R., & Kolagari, S. H. (2012). Assessment of hepatomegaly and liver enzymes in 100 patients with beta thalassemia major in Mashhad, Iran. *Iranian Journal of Pediatric Hematology and Oncology*, 2(4), 171–177.
- Hastuti, R.P., Mariani, R., Ujiani, S., Sumardilah, D.S., & Elizar. (2023). Peningkatan kualitas hidup anak thalassemia pada masa pandemi Covid-19. *Jurnal Inovasi dan Penerapan Ipteks*, 11(1), 128–139. <https://doi.org/10.18196/berdikari.v11i1.17313>
- He, Z., & Russell, J. E. (2002). A human embryonic hemoglobin inhibits Hb S polymerization in vitro and restores a normal phenotype to mouse models of sickle cell disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(16), 10635–10640. <https://doi.org/10.1073/pnas.162269099>
- He, L. N., Chen, W., Yang, Y., Xie, Y. J., Xiong, Z. Y., Chen, D. Y., Lu, D., Liu, N. Q., Yang, Y. H., & Sun, X. F. (2019). Elevated prevalence of abnormal glucose metabolism and other endocrine disorders in patients with β -thalassemia major: A meta-analysis. *BioMed Research International*, 2019, 6573497. <https://doi.org/10.1155/2019/6573497>
- Hershko, C., & Rachmilewitz, E. A. (1979). Mechanism of desferrioxamine-induced iron excretion in thalassaemia. *British Journal of Haematology*, 42(1), 125–132. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.1979.tb03704.x>
- Hernaningsih, Y., Syafitri, Y., Indrasari, Y. N., Rahmawan, P. A., Andarsini, M. R., Lesmana, I., Moses, E. J., Abdul Rahim, N. A., & Yusoff, N. M. (2022). Analysis of common beta-thalassemia (β -thalassemia) mutations in East Java, Indonesia. *Frontiers in Pediatrics*, 10, 925599. <https://doi.org/10.3389/fped.2022.925599>

- Heshusius, S., Grech, L., Gillemans, N., Brouwer, R. W. W., den Dekker, X. T., van IJcken, W. F. J., Nota, B., Felice, A. E., van Dijk, T. B., von Lindern, M., Borg, J., van den Akker, E., & Philipson, S. (2022). Epigenomic analysis of KLF1 haploinsufficiency in primary human erythroblasts. *Scientific Reports*, *12*(1), 336. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-04126-6>
- Hripscsak, G., Zhang, L., Chen, Y., Li, K., Suchard, M. A., Ryan, P. B., Scuemie, M. J. (2025). Assessing covariate balance with small sample sizes. *MedRxiv*, 2024.04.23.24306230. <https://doi.org/10.1101/2024.04.23.24306230>
- Huang, T.L., Zhang, T.Y., Song, C.Y., Lin, Y.B., Sang, B.H., Lei, Q.L., Lv, Y., Yang, C.H., Li, N., Tian, X., Yang, Y.H., & Zhang, X.W. (2020). Gene mutation spectrum of thalassemia among children in Yunnan Province. *Front Pediatr*, *8*, 159. <https://doi.org/10.3389/fped.2020.00159>
- Ibrahim, H. A., Fouda, M. I., Yahya, R. S., Abousamra, N. K., & Abd Elazim, R. A. (2014). Erythrocyte phosphatidylserine exposure in β -thalassemia. *Laboratory Hematology*, *20*(2), 9–14. <https://doi.org/10.1532/LH96.12016>
- Irdawati, I., Syaiful, A. A., & Haryani, A. (2021). Hubungan usia anak penderita thalassemia dengan frekuensi transfusi. *Jurnal Berita Ilmu Keperawatan*, *14*(2), 73–79. <https://doi.org/10.23917/bik.v14i2.11424>
- Islam, T., Wasim, M., Akhter, N., Sharmin, M., Islam, K. M. K., Rahman, S. N., & Alam, S. (2025). Thalassemia and reproductive health: An analysis of gonadal function in beta thalassemia major patients in a tertiary care population. *Scholars Journal of Applied Medical Sciences*, *13*(1), 142–147. <https://doi.org/10.36347/sjams.2025.v13i01.023>
- Jain, J. K., Vaishnav, J. G., Vohra, A. S., Shah, M., Goyal, A., Kansagara, M., & Gohil, P. (2022). Study of endocrinological complications in children with beta thalassemia major. *International Journal of Contemporary Pediatrics*, *9*(11), 1063–1067. <https://doi.org/10.18203/2349-3291.ijcp20222767>
- Jalali, S., Hassan, M. B., Mahboob, S., & Jabeen, F. (2011). Prevalence of β -thalassemic patients associated with consanguinity and anti-HCV antibody positivity: A cross-sectional study. *Pakistan Journal of Zoology*, *43*(1), 29–36.
- Jia, S., Jia, W., Yu, S., Hu, Y., & He, Y. (2020). Using microarray analysis to identify genes and pathways that regulate fetal hemoglobin levels. *Annals of Human Genetics*, *84*(1), 29–36. <https://doi.org/10.1111/ahg.12346>
- Jariwala, K., Mishra, K., & Ghosh, K. (2019). Comparative study of alloimmunization against red cell antigens in sickle cell disease & thalassaemia major patients on regular red cell transfusion. *Indian Journal of Medical Research*, *149*(1), 34–40. https://doi.org/10.4103/ijmr.IJMR_940_17
- Jiang, J., Best, S., Menzel, S., Silver, N., Lai, M. I., Surdulescu, G. L., Spector, T. D., & Thein, S. L. (2006). cMYB is involved in the regulation of fetal hemoglobin production in adults. *Blood*, *108*(3), 1077–1083. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-01-008912>
- Kalantri, S. A., Ray, R., Choudhuri, S., Roy, S., & Bhattacharyya, M. (2020). Key determinants of phenotypic heterogeneity of Hb E/ β -thalassemia: A comparative study from Eastern India. *Indian Journal of Hematology & Blood Transfusion*, *36*(1), 123–128. <https://doi.org/10.1007/s12288-019-01176-9>

- Kamal, S., Abdelhakam, S., Ghoraba, D., Mohsen, M. A., Salam, A. A., Hassan, H., & Nabeigh, L. (2019). The course of hepatitis C infection and response to antiviral therapy in patients with thalassemia major and hepatitis C infection: A longitudinal, prospective study. *Mediterranean Journal of Hematology and Infectious Diseases*, *11*(1), e2019060. <https://doi.org/10.4084/MJHID.2019.060>
- Karakukcu, M., Karakukcu, C., unal, E., Ozturk, A., Ciraci, Z., Patiroglu, T., Ozdemir, M.A. (2015). The importance of nucleated red blood cells in patients with beta thalassemia major and comparison of two automated systems with manual microscopy and flow cytometry. *Clin Lab*, *61*(9):1289-95. <https://doi.org/10.7754/clin.lab.2015.141250>
- Karimi, M., Bagheri, M. H., Tahmtan, M., Shakibafard, A., & Rashid, M. (2009). Prevalence of hepatosplenomegaly in beta thalassemia minor subjects in Iran. *European Journal of Radiology*, *69*(1), 120–122. <https://doi.org/10.1016/j.ejrad.2007.09.027>
- Karnpean, R., Tepakhan, W., Rungruang, K., Pongpatchara, P., Kuttasirisuk, P., Asawarat, P., & Jomoui, W. (2024). The validation of whole β -globin gene sequencing for detecting β -thalassemia mutations found in Thailand using next-generation sequencing (NGS). *Hemoglobin*, *48*(5), 333–340. <https://doi.org/10.1080/03630269.2024.2425031>
- Kaur, S., Ali, A., Ahmad, U., et al. (2019). Role of single nucleotide polymorphisms (SNPs) in common migraine. *Egyptian Journal of Neurology, Psychiatry and Neurosurgery*, *55*, 47. <https://doi.org/10.1186/s41983-019-0093-8>
- Kay, J. G., & Grinstein, S. (2013). Phosphatidylserine-mediated cellular signaling. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, *991*, 177–193. https://doi.org/10.1007/978-94-007-6331-9_10
- Kay, J. G., & Fairn, G. D. (2019). Distribution, dynamics and functional roles of phosphatidylserine within the cell. *Cell Communication and Signaling*, *17*(1), 126. <https://doi.org/10.1186/s12964-019-0438-z>
- Khandros, E., & Blobel, G. A. (2024). Elevating fetal hemoglobin: Recently discovered regulators and mechanisms. *Blood*, *144*(8), 845–852. <https://doi.org/10.1182/blood.2023022190>
- Khanzada, F. A., Asghar, S., Chohan, U., Najam, S., Rajput, K. K., Sami, A., & Ameer, R. (2024). The prevalence and distribution of beta thalassemia trait among outpatient individuals in a tertiary care hospital of Lodhran, Pakistan. *Pakistan Journal of Health Sciences*, *5*(11), 191–196. <https://doi.org/10.54393/pjhs.v5i11.2473>
- Kim, C. H. (2010). Homeostatic and pathogenic extramedullary hematopoiesis. *Journal of Blood Medicine*, *1*, 13–19. <https://doi.org/10.2147/JBM.S7224>
- Koboldt, D. C., Miller, R. D., & Kwok, P. Y. (2006). Distribution of human SNPs and its effect on high-throughput genotyping. *Human Mutation*, *27*(3), 249–254. <https://doi.org/10.1002/humu.20286>
- Kumar, S., & Chauhan, S. (2024). Splenectomy in thalassemia: The role of surgery as an adjunct to medical management. *Cureus*, *16*(6), e62834. <https://doi.org/10.7759/cureus.62834>
- Kuno, S., Penglong, T., & Srinoun, K. (2019). Anemia severity in β -thalassemia correlates with elevated levels of microRNA-125b in activated phagocytic monocytes. *Hemoglobin*, *43*(3), 155–161.

<https://doi.org/10.1080/03630269.2019.1628043>

- La, Q.D., Faltas, M., Zavareh, A., Gul, Z., Uzzi, U., Kahlam, J.S., Baloch, A., Revuri, N., Bachhu, S., & Ayub, M. (2025). Iron Overload, Clonal Hematopoiesis, and Cancer Risk in Aging and Transfusion-Dependent Populations: A Literature Review. *Cureus*, *17*(6), e85936. <https://doi.org/10.7759/cureus.85936>
- Lai, Y., Chen, Y., Chen, B., Zheng, H., Yi, S., Li, G., Wei, H., He, S., & Zheng, C. (2016). Genetic variants at BCL11A and HBS1L-MYB loci influence HbF levels in Chinese Zhuang β -thalassemia intermedia patients. *Hemoglobin*, *40*(6), 405–410. <https://doi.org/10.1080/03630269.2016.1253586>
- Lai, K., Jia, S., Yu, S., Luo, J., & He, Y. (2017). Genome-wide analysis of aberrantly expressed lncRNAs and miRNAs with associated co-expression and ceRNA networks in β -thalassemia and hereditary persistence of fetal hemoglobin. *Oncotarget*, *8*(30), 49931–49943. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.18263>
- Lam, C. W., & Mak, C. M. (2006). Allele dropout in PCR-based diagnosis of Wilson disease: Mechanisms and solutions. *Clinical Chemistry*, *52*(3), 517–520. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2005.060491>
- Lantip, R. (2019). *Talasemia: Genetik dasar dan pengelolaan terkini*. Universitas Jenderal Soedirman.
- Lee, J., Cho, S. I., Park, S. S., & Seong, M. (2021). Molecular basis and diagnosis of thalassemia. *Blood Research*, *56*(Suppl. 1), S39–S43. <https://doi.org/10.5045/br.2021.2020332>
- Leventis, P. A., & Grinstein, S. (2010). The distribution and function of phosphatidylserine in cellular membranes. *Annual Review of Biophysics*, *39*, 407–427. <https://doi.org/10.1146/annurev.biophys.093008.131234>
- Li, J., Glessner, J. T., Zhang, H., Hou, C., Wei, Z., Bradfield, J. P., Mentch, F. D., Guo, Y., Kim, C., Xia, Q., Chiavacci, R. M., Thomas, K. A., Qiu, H., Grant, S. F., Furth, S. L., Hakonarson, H., & Sleiman, P. M. (2013). GWAS of blood cell traits identifies novel associated loci and epistatic interactions in Caucasian and African-American children. *Human Molecular Genetics*, *22*(7), 1457–1464. <https://doi.org/10.1093/hmg/dd534>
- Li, Y., Zhang, Y., Qin, L., Shang, H., Li, P., Xiao, B., Ye, Y., Xu, X., Zhang, X., & Wang, L. (2023). Analysis of hematological indices and splenectomy rates in 2,130 patients with hemoglobin H diseases or β -thalassemia. *Acta Haematologica*, *146*(6), 458–464. <https://doi.org/10.1159/000533233>
- Li, Y., Wang, M., Luo, Q., Yang, H., Zhao, D., Jin, J., Zhang, P. (2025). Recapitulating HPFH by CRISPR-Cas9 editing of γ -globin regulators to reactivate γ -globin expression. *Research Square*, *8*(2025), 1–15. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-7301640/v1>
- Liang, P.K., Shan, K.Z., Chou, R., Wan, Y.C.S., Delahunty, M., Khandelwal, S., Francis, S., Arepally, G., Telen, M.J., Yang, H. (2024). Molecular mechanism underlying excessive phosphatidylserine exposure in sickle red blood cells and potential therapeutics. *Blood*, *144*(1), 174. <https://doi.org/10.1182/blood-2024-199340>
- Lin, Y., Zheng, X., Chen, J., Luo, D., Xie, J., Su, Z., Huang, X., Yi, X., Wei, L., Cai, J., & Sun, Z. (2020). Protective effect of *Bruguiera gymnorrhiza* (L.) Lam. fruit on dextran sulfate sodium-induced ulcerative colitis in mice: Role

- of Keap1/Nrf2 pathway and gut microbiota. *Frontiers in Pharmacology*, *10*, 1602. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.01602>
- Liu, X., Shihara, M., Taniwaki, N., Shirasaka, N., Atsumi, Y., & Shiojiri, M. (2015). Phosphatidylserine: Biology, technologies, and applications. In M. U. Ahmad & X. Xu (Eds.), *Polar lipids* (pp. 145–184). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-1-63067-044-3.50010-8>
- Loh, J. B., Ross, J. M., Musallam, K. M., & Kuo, K. H. M. (2024). Trans-acting genetic modifiers of clinical severity in heterozygous β -thalassemia trait. *Annals of Hematology*, *103*(11), 4437–4447. <https://doi.org/10.1007/s00277-024-06007-0>
- Longo, F., Piolatto, A., Ferrero, G. B., & Piga, A. (2021). Ineffective erythropoiesis in β -thalassaemia: Key steps and therapeutic options by drugs. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(13), 7229. <https://doi.org/10.3390/ijms22137229>
- Mahajan, S., Dhule, S., & Taksande, R. V. (2023). Prevalence and profile of beta-thalassemia: A prospective analysis at a tertiary care center. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, *16*(5), 174–176. <https://doi.org/10.22159/ajpcr.2023.v16i5.47258>
- Majumder, R. (2022). Phosphatidylserine regulation of coagulation proteins factor IXa and factor VIIIa. *The Journal of Membrane Biology*, *255*(6), 733–737. <https://doi.org/10.1007/s00232-022-00265-7>
- Mandal, P. (2025). Prevalence and hematological profile of beta thalassemia trait in an urban Indian population: A cross-sectional study from Chandigarh. *Interdisciplinary Journal of the African Alliance for Research, Advocacy and Innovation*, *1*(2), 1–12. <https://doi.org/10.64261/ijaarai.v1n2.003>
- Mannoor, K., Hossain, M., Noor, F.A., Bhuyan, G.S., Qadri, S.S. (2019). Role of XmnI polymorphism in HbF induction in HBE/ β and β -thalassaemia patients. *Bangladesh Medical Research Council Bulletin*, *45*(3), 133–142. <https://doi.org/10.3329/bmrcb.v45i3.44642>
- Mariani, R., Trombini, P., Pozzi, M., & Piperno, A. (2009). Iron metabolism in thalassemia and sickle cell disease. *Mediterranean Journal of Hematology and Infectious Diseases*, *1*(1), e2009006. <https://doi.org/10.4084/MJHID.2009.006>
- Martin, A., & Thompson, A. A. (2013). Thalassemias. *Pediatric Clinics of North America*, *60*(6), 1383–1391. <https://doi.org/10.1016/j.pcl.2013.08.008>
- Masud, A. H., Hasan, M. K., Sinha, S. K., Islam, K. M. K., & Rahman, M. J. (2020). Clinical and socio-demographic pattern of beta thalassaemia in Bangladesh. *Haematology Journal of Bangladesh*, *4*(1), 3–7. <https://doi.org/10.37545/haematoljbd202046>
- Meghji, K. A., Memon, M. U., Siyal, A. R., Memon, H. A., Wadhvani, P., & Khan, A. (2025). Impact of transfusion frequency and iron overload on splenomegaly in β -thalassemia major: A cross-sectional study. *Rawal Medical Journal*, *50*(3), 615–619. <https://doi.org/10.5455/rmj.20241224043952>
- Menzel, S., & Thein, S. L. (2019). Genetic modifiers of fetal haemoglobin in sickle cell disease. *Molecular Diagnosis & Therapy*, *23*(2), 235–244. <https://doi.org/10.1007/s40291-018-0370-8>

- Mettananda, S., & Higgs, D. R. (2018). Molecular basis and genetic modifiers of thalassemia. *Hematology/Oncology Clinics of North America*, 32(2), 177–191. <https://doi.org/10.1016/j.hoc.2017.11.003>
- Miccio, A., & Blobel, G. A. (2010). Role of the GATA-1/FOG-1/NuRD pathway in the expression of human beta-like globin genes. *Molecular and Cellular Biology*, 30(14), 3460–3470. <https://doi.org/10.1128/MCB.00001-10>
- Mohammad, S. N. N. A., Ibrahimi, S., Wan Ab Rahman, W. S., Hassan, M. N., Edinur, H. A., Azlan, M., & Zulkafli, Z. (2022). Single nucleotide polymorphisms in XMN1-HBG2, HBS1L-MYB, and BCL11A and their relation to high fetal hemoglobin levels that alleviate anemia. *Diagnostics*, 12(6), 1374. <https://doi.org/10.3390/diagnostics12061374>
- Munkongdee, T., Chen, P., Winichagoo, P., Fucharoen, S., & Paiboonsukwong, K. (2020). Update in laboratory diagnosis of thalassemia. *Front Mol Biosci*, 7, 74. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2020.00074>.
- Munkongdee, T., Tongsima, S., Ngamphiw, C., Wangkumhang, P., Peerapittayamongkol, C., Hashim, H. B., Fucharoen, S., & Svasti, S. (2021). Predictive SNPs for β -thalassemia/HbE disease severity. *Scientific Reports*, 11(1), 10352. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-89641-2>
- Musallam, K. M., Vitrano, A., Inzerillo, A., Di Maggio, R., Barone, R., Giangreco, A., Renda, M. C., Fecarotta, E., Troia, A., Giambona, A., Ruffo, G. B., Vlachaki, E., Venou, T. M., Ricchi, P., Ziello, B., Serra, M., Colizzi, E., Longo, F., Culcasi, M., & Maggio, A. (2025). Lifetime risk of liver disease in patients with β -thalassemia: Data from the de-LIGHT retrospective cohort study. *European Journal of Haematology*, 115(3), 278–286. <https://doi.org/10.1111/ejh.14446>
- Musallam, K. M., Rivella, S., Vichinsky, E., & Rachmilewitz, E. A. (2013). Non-transfusion-dependent thalassemias. *Haematologica*, 98(6), 833–844. <https://doi.org/10.3324/haematol.2012.066845>
- Mussolino, C., & Strouboulis, J. (2021). Recent approaches for manipulating globin gene expression in treating hemoglobinopathies. *Frontiers in Genome Editing*, 3, 618111. <https://doi.org/10.3389/fgeed.2021.618111>
- Nagata, S., Suzuki, J., Segawa, K., & Fujii, T. (2016). Exposure of phosphatidylserine on the cell surface. *Cell Death and Differentiation*, 23(6), 952–961. <https://doi.org/10.1038/cdd.2016.7>
- Nagata, S., Sakuragi, T., & Segawa, K. (2020). Flippase and scramblase for phosphatidylserine exposure. *Current Opinion in Immunology*, 62, 31–38. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2019.11.009>
- Nawaz, K., Khan, S. N., Bashir, A., Rehman, A., Khan, T. M., Mir, A., & Ahmad, S. (2024). Unraveling impact of hemoglobin F and A2 levels: Correlation with disease severity and treatment response in transfusion-dependent beta-thalassemia. *Cureus*, 16(1), e52002. <https://doi.org/10.7759/cureus.52002>
- Needs, T., Gonzalez-Mosquera, L. F., & Lynch, D. T. (2023). Beta thalassemia. In *StatPearls*. StatPearls Publishing. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK531481/>
- Nienhuis, A. W., & Nathan, D. G. (2012). Pathophysiology and clinical manifestations of the β -thalassemias. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2(12), a011726. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a011726>
- Nuinoon, M., Makarasara, W., Mushiroda, T., Setianingsih, I., Wahidiyat, P. A.,

- Sripichai, O., Kumasaka, N., Takahashi, A., Svasti, S., Munkongdee, T., Mahasirimongkol, S., Peerapittayamongkol, C., Viprakasit, V., Kamatani, N., Winichagoon, P., Kubo, M., Nakamura, Y., & Fucharoen, S. (2010). A genome-wide association identified the common genetic variants influence disease severity in beta0-thalassemia/hemoglobin E. *Human Genetics*, *127*(3), 303–314. <https://doi.org/10.1007/s00439-009-0770-2>
- Oikonomidou, P. R., Casu, C., & Rivella, S. (2016). New strategies to target iron metabolism for the treatment of beta thalassemia. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *1368*(1), 162–168. <https://doi.org/10.1111/nyas.13018>
- Olivieri, N. F. (1999). The beta-thalassemias. *New England Journal of Medicine*, *341*(2), 99–109. <https://doi.org/10.1056/NEJM199907083410207>
- Olivieri, N. F., Pakbaz, Z., & Vichinsky, E. (2010). HbE/ β -thalassemia: Basis of marked clinical diversity. *Hematology/Oncology Clinics of North America*, *24*(6), 1055–1070. <https://doi.org/10.1016/j.hoc.2010.08.008>
- Olivieri, N. F., Pakbaz, Z., & Vichinsky, E. (2011). Hb E/beta-thalassaemia: A common and clinically diverse disorder. *The Indian Journal of Medical Research*, *134*(4), 522–531.
- Origa, R. (2017). β -Thalassemia. *Genetics in Medicine*, *19*(6), 609–619. <https://doi.org/10.1038/gim.2016.173>
- Prahasanti, K., Ashariati, A., Herawati, L., Romadhon, P. Z., Mahdi, B. A., Dzakiyah, A. Z., Cahyono, M. B. A., & Yusoff, N. M. (2025). Ineffective erythropoiesis markers in β -thalassemia: A systematic review. *Journal of Clinical Medicine*, *15*(1), 308. <https://doi.org/10.3390/jcm15010308>
- Razaq, M. A., Taylor, S., Roberts, D. J., & Carpenter, L. (2017). A molecular roadmap of definitive erythropoiesis from human induced pluripotent stem cells. *British Journal of Haematology*, *176*(6), 971–983. <https://doi.org/10.1111/bjh.14491>
- Rujito, L., Basalamah, M., Siswandari, W., Setyono, J., Wulandari, G., Mulatsih, S., Sofro, A. S., Sadewa, A. H., & Sutaryo, S. (2016). Modifying effect of XmnI, BCL11A, and HBS1L-MYB on clinical appearances: A study on β -thalassemia and hemoglobin E/ β -thalassemia patients in Indonesia. *Hematology/oncology and stem cell therapy*, *9*(2), 55–63. <https://doi.org/10.1016/j.hemonc.2016.02.003>
- Park, S. Y., Lee, S. J., Cho, H. J., Kim, J. T., Yoon, H. R., Lee, K. H., Kim, B. Y., Lee, Y., & Lee, H. G. (2019). Epsilon-globin HBE1 enhances radiotherapy resistance by down-regulating BCL11A in colorectal cancer cells. *Cancers*, *11*(4), 498. <https://doi.org/10.3390/cancers11040498>
- Pandit, R. A., Svasti, S., Sripichai, O., Munkongdee, T., Triwitayakorn, K., Winichagoon, P., Fucharoen, S., & Peerapittayamongkol, C. (2008). Association of SNP in exon 1 of HBS1L with hemoglobin F level in beta0-thalassemia/hemoglobin E. *International Journal of Hematology*, *88*(4), 357–361. <https://doi.org/10.1007/s12185-008-0167-3>
- Panigrahy, N., Lingappa, L., Ramadevi, A. R., & Venkatlakshmi, A. (2016). Congenital disorder of glycosylation (CDG) presenting as non-immune hydrops fetalis. *Indian Journal of Pediatrics*, *83*(4), 359–360. <https://doi.org/10.1007/s12098-015-1895-z>

- Pepe, A., Gamberini, M. R., Missere, M., Pistoia, L., Mangione, M., Cuccia, L., Spasiano, A., Maffei, S., Cadeddu, C., Midiri, M., Borgna, C., & Meloni, A.; Working Group of Gender Medicine of the Italian Society of Cardiology. (2018). Gender differences in the development of cardiac complications: A multicentre study in a large cohort of thalassaemia major patients to optimize the timing of cardiac follow-up. *British Journal of Haematology*, *180*(6), 879–888. <https://doi.org/10.1111/bjh.15125>
- Pereira, C., Relvas, L., Bento, C., Abade, A., Ribeiro, M. L., & Manco, L. (2015). Polymorphic variations influencing fetal hemoglobin levels: Association study in beta-thalassemia carriers and in normal individuals of Portuguese origin. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, *54*(4), 315–320. <https://doi.org/10.1016/j.bcmd.2015.02.001>
- Petrou, M. (2010). Screening for beta thalassaemia. *Indian Journal of Human Genetics*, *16*(1), 1–5. <https://doi.org/10.4103/0971-6866.64934>
- Phanrahan, P., Yamsri, S., Teawtrakul, N., Fucharoen, G., Sanchaisuriya, K., & Fucharoen, S. (2019). Molecular analysis of non-transfusion dependent thalassemia associated with hemoglobin E- β -thalassemia disease without α -thalassemia. *Mediterranean Journal of Hematology and Infectious Diseases*, *11*(1), e2019038. <https://doi.org/10.4084/MJHID.2019.038>
- Prasing, W., Mekki, C., Traisathit, P., Pissard, S., Pornprasert, S. (2018). Genotyping of BCL11A and HBS1L-MYB single nucleotide polymorphisms in β -thalassemia/HbE and homozygous HbE subjects with low and high levels of HbF. *Wailalak Journal of Science & Technology*, *15*(9), 627-636.
- Puar, N., Newell, B., & Shao, L. (2019). Blueberry muffin skin lesions in an infant with epsilon gamma delta beta thalassemia. *Pediatric and Developmental Pathology*, *22*(6), 599–600. <https://doi.org/10.1177/1093526619850663>
- Pulica, R., Aquib, A., Varsanyi, C., Gadiyar, V., Wang, Z., Frederick, T., Calianese, D. C., Patel, B., de Dios, K. V., Poalasin, V., De Lorenzo, M. S., Kotenko, S. V., Wu, Y., Yang, A., Choudhary, A., Sriram, G., & Birge, R. B. (2025). Dys-regulated phosphatidylserine externalization as a cell intrinsic immune escape mechanism in cancer. *Cell Communication and Signaling*, *23*(1), 131. <https://doi.org/10.1186/s12964-025-02090-6>
- Qurat-ul-Ain, L.A., Hassan, M., Rana, S.M., Jabeen, F. (2011). Prevalence of β -thalassemic patients associated with consanguinity and anti-HCV-antibody positivity – A cross sectional study. *Pakistan Journal of Zoology*, *43*(1), 29-36.
- Rashid, M. A. ul H., & Abbasi, S.-U.-R. S. (2020). Theorizing beta thalassemia major: An overview of health sociology. *International and Multidisciplinary Journal of Social Sciences*, *9*(1), 51–75. <https://doi.org/10.17583/rimcis.2020.5113>
- Razak, S. A. A., Murad, N. A. A., Masra, F., Chong, D. L. S., Abdullah, N., Jalil, N., Alauddin, H., Sabudin, R. Z. A. R., Ithnin, A., Khai, L. C., Aziz, N. A., Muda, Z., Ibrahim, H., & Latiff, Z. A. (2018). Genetic modifiers of fetal haemoglobin (HbF) and phenotypic severity in β -thalassemia patients. *Current Molecular Medicine*, *18*(5), 295–305. <https://doi.org/10.2174/1566524018666181004121604>
- Rehman, A., Meghji, K.A., Memon, H.A., Burney, A.M., Siyal, W.U.R., Jawad, M.

- (2024). Correlation between hepatomegaly and transfusion frequency in thalassemia patients: A cross-sectional study. *The Professional Medical Journal*, 31(2), 277–282. <https://doi.org/10.29309/TPMJ/2024.31.02.7729>
- Rejeki, D., Utami, Y., & Narulita, S. (2021). Family support to adolescents with thalassemia. *Jurnal Mitra Kesehatan*, 4(IAHSC), 19–24. <https://doi.org/10.47522/jmk.v1i1IAHSC.108>
- Rivella, S. (2009). Ineffective erythropoiesis and thalassemias. *Current Opinion in Hematology*, 16(3), 187–194. <https://doi.org/10.1097/MOH.0b013e32832990a4>
- Romanenko, N., Shilova, E., Lastochkina, D., & Gritsaev, S. (2023). Transfusional iron overload and associated complications in hematology disorders patients. *HemaSphere*, 7(Suppl. 3), e620020e. <https://doi.org/10.1097/01.HS9.0000976952.62002.0e>
- Roosjen, M., McColl, B., Kao, B., Gearing, L. J., Blewitt, M. E., & Vadolas, J. (2014). Transcriptional regulators Myb and BCL11A interplay with DNA methyltransferase 1 in developmental silencing of embryonic and fetal β -like globin genes. *The FASEB Journal*, 28(4), 1610–1620. <https://doi.org/10.1096/fj.13-242669>
- Rujito, L. (2019). *Buku referensi thalassemia: Genetik dasar dan pengelolaan terkini*. Universitas Jenderal Soedirman: Purwokerto.
- Sadek, M. M., Ahmed, A. S., El Fiky, S. M., Tantawy, S. I., & Hassan, A. M. (2022). Phosphatidylserine and the thrombin–antithrombin complex as markers for hypercoagulability in Egyptian beta-thalassemia patients. *The Egyptian Journal of Haematology*, 47(3), 210–216. https://doi.org/10.4103/ejh.ejh_45_21
- Sadiq, I. Z., Abubakar, F. S., Usman, H. S., Abdullahi, A. D., Ibrahim, B., Kastayal, B. S., Ibrahim, M., & Hassan, H. A. (2024). Thalassemia: Pathophysiology, diagnosis, and advances in treatment. *Thalassemia Reports*, 14(4), 81–102. <https://doi.org/10.3390/thalassrep14040010>
- Salama, K., Khaled, H. Z., El Dien, H. M. S., Afifi, R. A.-R. A.-A., Shaheen, N. M. M., & El Wahab, M. A. M. A. (2022). Assessment of cardiac functions and arrhythmia in children with beta-thalassemia major and beta-thalassemia intermedia. *Open Access Macedonian Journal of Medical Sciences*, 10(B), 890–895. <https://doi.org/10.3889/oamjms.2022.9026>
- Sales, R.R., Belisario, A.R., Faria, G., Mendes, F., Luizon, M.R., Viana, M.B. (2020). Functional polymorphisms of BCL11A and HBS1L-MYB genes affect both fetal hemoglobin level and clinical outcomes in a cohort of children with sickle cell anemia. *Ann Hematol*, 99(7):1453-1463. <https://doi.org/10.1007/s00277-020-04079-2>.
- Salih, K. M., & Al-Mosawy, W. F. (2016). Influence of blood transfusion rate on some clinical manifestations in β -thalassaemia major patients. *Journal of Contemporary Medical Sciences*, 2(5), 15–19. <https://doi.org/10.22317/jcms.v2i5.62>
- Sanchez-Villalobos, M., Blanquer, M., Moraleda, J. M., Salido, E. J., & Perez-Oliva, A. B. (2022). New insights into pathophysiology of β -thalassemia. *Frontiers in Medicine*, 9, 880752. <https://doi.org/10.3389/fmed.2022.880752>

- Saqer, L. S., Almasri, M. Z., Almasri, S. A., & Almasri, Z. A. (2016). Prevalence of beta-thalassemia trait among students of the University College of Science and Technology–Palestine. *American Journal of Life Sciences*, 4(2), 40–46. <https://doi.org/10.11648/j.ajls.20160402.14>
- Shah F, Huey K, Deshpande S, Turner M, Chitnis M, Schiller E, Yucel A, Moro Bueno L, Oliva EN. (2022). Relationship between Serum Ferritin and Outcomes in β -Thalassemia: A Systematic Literature Review. *J Clin Med*, 11(15):4448. doi: <https://doi.org/10.3390/jcm11154448>.
- Shang, X., & Xu, X. (2017). Update in the genetics of thalassemia: What clinicians need to know. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology*, 39, 3–15. <https://doi.org/10.1016/j.bpobgyn.2016.10.012>
- Sharma, A., Boelens, J. J., Cancio, M., Hankins, J. S., Bhad, P., Azizy, M., Lewandowski, A., Zhao, X., Chitnis, S., Peddinti, R., Zheng, Y., Kapoor, N., Ciceri, F., Maclachlan, T., Yang, Y., Liu, Y., Yuan, J., Naumann, U., Yu, V. W. C., ... LaBelle, J. L. (2023). CRISPR-Cas9 editing of the HBG1 and HBG2 promoters to treat sickle cell disease. *The New England Journal of Medicine*, 389(9), 820–832. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2215643>
- Shawkat, A. J., & Jwaid, A. H. (2019). Clinical complications of beta-thalassemia major. *Iraqi Journal of Pharmaceutical Sciences*, 28(2), 1–8. <https://doi.org/10.31351/vol28iss2pp1-8>
- Shen, Y., Li, R., Teichert, K., Montbleau, K. E., Verboon, J. M., Voit, R. A., & Sankaran, V. G. (2021). Pathogenic BCL11A variants provide insights into the mechanisms of human fetal hemoglobin silencing. *PLoS Genetics*, 17(10), e1009835. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1009835>
- Silva, F. C., Torrezan, G. T., Brianese, R. C., Stabellini, R., & Carraro, D. M. (2017). Pitfalls in genetic testing: A case of a SNP in primer-annealing region leading to allele dropout in BRCA1. *Molecular Genetics & Genomic Medicine*, 5(4), 443–447. <https://doi.org/10.1002/mgg3.295>
- Singha, K., Taweenan, W., Fucharoen, G., & Fucharoen, S. (2019). Erythrocyte indices in a large cohort of β -thalassemia carrier: Implication for population screening in an area with high prevalence and heterogeneity of thalassemia. *International Journal of Laboratory Hematology*, 41(4), 513–518. <https://doi.org/10.1111/ijlh.13035>
- Silberstein, P. T., Do, V., & Tran, H. (2014). The thalassemias. In *Reference module in biomedical sciences*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.05342-3>
- Soliman, A.T., Yassin, M., Alyafei, F., Alaaraj, N., Hamed, N., Osman, S., Soliman, N. (2023). Nutritional studies in patients with β -thalassemia major: A short review. *Acta Biomed*, 94(3):e2023187. <https://doi.org/10.23750/abm.v94i3.14732>.
- Spinelli, S., Straface, E., Gambardella, L., Caruso, D., Dossena, S., Marino, A., Morabito, R., & Remigante, A. (2025). Iron overload-related oxidative stress leads to hyperphosphorylation and altered anion exchanger 1 (band 3) function in erythrocytes from subjects with β -thalassemia minor. *International Journal of Molecular Sciences*, 26(4), 1593. <https://doi.org/10.3390/ijms26041593>

- Stadhouders, R., Aktuna, S., Thongjuea, S., Aghajani-refah, A., Pourfarzad, F., van IJcken, W., Lenhard, B., Rooks, H., Best, S., Menzel, S., Grosveld, F., Thein, S. L., & Soler, E. (2014). HBS1L-MYB intergenic variants modulate fetal hemoglobin via long-range MYB enhancers. *Journal of Clinical Investigation*, *124*(4), 1699–1710. <https://doi.org/10.1172/JCI71520>
- Steinberg, M. H. (2022). Targeting fetal hemoglobin expression to treat β hemoglobinopathies. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, *26*(4), 347–359. <https://doi.org/10.1080/14728222.2022.2066519>
- Susanto, Z., Siswandari, W., & Rujito, L. (2019). Cd60 (GTG > GAG)/Hb Cagliari mutation was found in scanning of β -thalassemia alleles from patients of East Kalimantan, Indonesia. *Molecular Genetics and Metabolism Reports*, *22*, 100550. <https://doi.org/10.1016/j.ymgmr.2019.100550>
- Syed, S. (2023). Massive splenomegaly in transfusion-dependent beta-thalassemia necessitating splenectomy. *American Journal of Gastroenterology*, *118*(Suppl. 10), S2069–S2070. <https://doi.org/10.14309/01.ajg.0000961972.06761.c3>
- Synodinos, J.T., Vrettou, C., Sofocleous, C., Zurlo, M., Finotti, A., Gambari, R. (2024). Impact of α -Globin gene expression and α -Globin modifiers on the phenotype of β -thalassemia and other hemoglobinopathies: Implications for patient management. *Int J Mol Sci*, *25*(6), 3400. <https://doi.org/10.3390/ijms25063400>
- Taher, A. T., & Saliba, A. N. (2017). Iron overload in thalassemia: Different organs at different rates. *Hematology: American Society of Hematology Education Program*, *2017*(1), 265–271. <https://doi.org/10.1182/asheducation-2017.1.265>
- Taher, A.T., Weatherall, D.J., & Cappellini, M.D. (2018). Thalassaemia. *Lancet*, *391*(10116):155-167. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)31822-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)31822-6)
- Teh, L. K., Koh, S. Y., Chua, S. M., George, E., Lai, M. I., & Wong, L. (2017). Genetic variants in HBS1L-MYB rs9399137 and rs11759553 associated with elevated HbF levels among Filipino β^0 -deletion carriers. *Extended Abstracts for GG2020 Conference 2017*, *2*(2), 28–29.
- Thein, S. L. (2018). Molecular basis of β -thalassemia and potential therapeutic targets. *Blood Cells, Molecules & Diseases*, *70*, 54–65. <https://doi.org/10.1016/j.bcmd.2017.06.001>
- Toruan, I.L., Fianza, P.I., Prihatni, D. (2020). Platelet-derived microparticle count in β -thalassemia patients with direct labelling monoclonal antibody CD62P and CD41. *Majalah Kedokteran Bandung*, *52*(2), 92–8. <https://doi.org/10.15395/mkb.v52n2.1836>
- Tripathi, P., Agarwal, S., Mandal, K., Gupta, A., & Sarangi, A. N. (2023). Impact of genetic polymorphisms in modifier genes in determining fetal hemoglobin levels in beta-thalassemia. *Thalassemia Reports*, *13*(1), 85–112. <https://doi.org/10.3390/thalassrep13010009>
- Tsilionis, V., Moustakli, E., Dafopoulos, S., Zikopoulos, A., Sotiriou, S., Zachariou, A., & Dafopoulos, K. (2024). Reproductive health in women with major β -thalassemia: Evaluating ovarian reserve and endocrine complications. *Metabolites*, *14*(12), 717. <https://doi.org/10.3390/metabo14120717>
- Tumburu, L., & Thein, S. L. (2017). Genetic control of erythropoiesis. *Current Opinion in Hematology*, *24*(3), 173–182.

<https://doi.org/10.1097/MOH.0000000000000333>

- Udeze, C., Dovizio, M., Veronesi, C., Degli Esposti, L., Li, N., Dang, T. X. M. P., & Forni, G. L. (2023). Mortality and clinical complications among patients with transfusion-dependent beta-thalassemia in Italy. *HemaSphere*, 7(Suppl. 3), e91927ad. <https://doi.org/10.1097/01.HS9.0000972692.91927.ad>
- Upadhye, D., Jain, D., Trivedi, Y., Nadkarni, A., Ghosh, K., & Colah, R. (2016). Influence of single nucleotide polymorphisms in the BCL11A and HBS1L-MYB gene on the HbF levels and clinical severity of sickle cell anaemia patients. *Annals of Hematology*, 95(7), 1201–1203. <https://doi.org/10.1007/s00277-016-2675-1>
- Urrechaga, E., Hoffmann, J. J., Izquierdo, S., & Escanero, J. F. (2015). Differential diagnosis of microcytic anemia: The role of microcytic and hypochromic erythrocytes. *International Journal of Laboratory Hematology*, 37(3), 334–340. <https://doi.org/10.1111/ijlh.12290>
- Vallabhapurapu, S. D., Blanco, V. M., Sulaiman, M. K., Vallabhapurapu, S. L., Chu, Z., Franco, R. S., & Qi, X. (2015). Variation in human cancer cell external phosphatidylserine is regulated by flippase activity and intracellular calcium. *Oncotarget*, 6(33), 34375–34388. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.6045>
- Vegiopoulos, A., García, P., Emambokus, N., & Frampton, J. (2006). Coordination of erythropoiesis by the transcription factor c-Myb. *Blood*, 107(12), 4703–4710. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-07-2968>
- Voskou, S., Aslan, M., Fanis, P., Phylactides, M., & Kleanthous, M. (2015). Oxidative stress in β -thalassaemia and sickle cell disease. *Redox Biology*, 6, 226–239. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2015.07.018>
- Waggiallah, H.A. (2020). Phosphatidylserine as red cell eryptosis marker consolidating phagocytotic clearance. *Journal of Biochemical Technology*, 11(2), 77–81.
- Wahidiyat, P.A., Sari, T.T., Rahmartani, L.D., Setianingsih, I., Iskandar, S.D., Pranata, A.M., Yapiy, I., Yosia, M., & Tricta, F. (2020). An insight into Indonesian current thalassaemia care and challenges. *ISBT Science Series*, 15(3), 334–341. <https://doi.org/10.1111/voxs.12544>
- Wake, M., Palin, A., Belot, A., Berger, M., Lorgouilloux, M., Bichon, M., Papworth, J., Bayliss, L., Grimshaw, B., Rynkiewicz, N., Paterson, J., Poindron, A., Spearing, E., Carter, E., Hudson, R., Campbell, M., Petzer, V., Besson-Fournier, C., Latour, C., ... Meynard, D. (2024). A human anti-matriptase-2 antibody limits iron overload, α -globin aggregates, and splenomegaly in β -thalassemic mice. *Blood Advances*, 8(8), 1898–1907. <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2023012010>
- Wang, Y., Rank, G., Li, Z., Wang, Y., Ju, J., Nuber, A., Wu, Y., Liu, M., Nie, M., Huang, F., Cerruti, L., Ma, C., Tan, R., Schotta, G., Jane, S. M., Zeng, C. K., & Zhao, Q. (2016). ϵ -globin expression is regulated by SUV4-20h1. *Haematologica*, 101(5), e168–e172. <https://doi.org/10.3324/haematol.2015.139980>
- Wang, J., Yu, C., Zhuang, J., Qi, W., Jiang, J., Liu, X., Zhao, W., Cao, Y., Wu, H., Qi, J., & Zhao, R. C. (2022). The role of phosphatidylserine on the membrane in immunity and blood coagulation. *Biomarker Research*, 10(1), 4. <https://doi.org/10.1186/s40364-021-00346-0>

- Wautier, M. P., Héron, E., Picot, J., Colin, Y., Hermine, O., & Wautier, J. L. (2011). Red blood cell phosphatidylserine exposure is responsible for increased erythrocyte adhesion to endothelium in central retinal vein occlusion. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 9(5), 1049–1055. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2011.04251.x>
- Weatherall, D. J., & Clegg, J. B. (2001). *The thalassaemia syndromes*. Blackwell Science. <https://doi.org/10.1002/9780470696705>
- Westen, A. A., Kraaijenbrink, T., Robles de Medina, E. A., Hartevelde, J., Willemse, P., Zuniga, S. B., van der Gaag, K. J., Weiler, N. E. C., Warnaar, J., Kayser, M., Sijen, T., & de Knijff, P. (2014). Comparing six commercial autosomal STR kits in a large Dutch population sample. *Forensic Science International: Genetics*, 10, 55–63. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2014.01.008>
- Widadi, S. Y., Ramdani, H. T., & Nurafita, H. (2023). Kualitas hidup anak penderita thalassemia mayor usia 6-18 tahun di poliklinik thalassemia RSUD Dr. Slamet. *PREPOTIF: Jurnal Kesehatan Masyarakat*, 7(1), 226–236.
- Winichakoon, P., Tantiworawit, A., Rattanathammethee, T., Hantrakool, S., Adisaksopha, C. C., Rattarittamrong, E., Norasetthada, L., Charoenkwan, P. (2015). Prevalence and risk factors for complications in patients with nontransfusion dependent alpha- and beta-thalassaemia. *Anemia*, 2015, 793025. <https://doi.org/10.1155/2015/793025>
- Wood, J. C., Enriquez, C., Ghugre, N., Otto-Duessel, M., Aguilar, M., Nelson, M. D., Moats, R., & Coates, T. D. (2005). Physiology and pathophysiology of iron cardiomyopathy in thalassaemia. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1054, 386–395. <https://doi.org/10.1196/annals.1345.047>
- Youngest, R., Rusdianto, R., Kamisah, Y., Maskoen, A. M., & Safitri, R. (2025). *In silico* study of brazilin from secang wood (*Caesalpinia sappan* L.) as a candidate for splenomegaly therapy. *International Journal of Health Science and Technology*, 6(3), 2228–2239. <https://doi.org/10.31101/ijhst.v6i3.4032>
- Younus, L. A., Salman, H. F., Abdulrudha, K. H., et al. (2025). The effect of BCL11A gene (rs766432) and HBS1L-MYB gene (rs9399137) polymorphism on beta thalassaemia in Iraqi patients. *Egyptian Journal of Medical Human Genetics*, 26, 195. <https://doi.org/10.1186/s43042-025-00824-2>
- Yu, X., Kong, Y., Dore, L. C., Abdulmalik, O., Katein, A. M., Zhou, S., Choi, J. K., Gell, D., Mackay, J. P., Gow, A. J., & Weiss, M. J. (2007). An erythroid chaperone that facilitates folding of alpha-globin subunits for hemoglobin synthesis. *Journal of Clinical Investigation*, 117(7), 1856–1865. <https://doi.org/10.1172/JCI31664>
- Zahedpanah, M., Azarkeivan, A., Aghaiepour, M., Nikogoftar, M., AhmadiNegad, M., Hajibeigi, B., Tabatabaiee, M. R., & Maghsudlu, M. (2014). Erythrocytic phosphatidylserine exposure and hemostatic alterations in β-thalassaemia intermediate patients. *Hematology*, 19(8), 472–476. <https://doi.org/10.1179/1607845413Y.0000000148>
- Zainuddin, V., Abdullah, A. A., Arif, M. (2015). Talasemia beta hemoglobin E. *Indonesian Journal of Clinical Pathology and Medical Laboratory*, 21(3), 309–312.

- Zajac, B. K., Zehner, R., Scheiper, S., & Weissenberger, M. (2018). Kit-dependent discrepancy in D16S539 and general considerations for database matches. *Forensic Science International: Genetics*, 34, 148–151. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2018.02.012>
- Zhang, S., Chen, Z., Chen, M., & Huang, H. (2024). Current status and trends in thalassemia burden across South, East, and Southeast Asia, 1990–2021: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2021. *BMC Public Health*, 24(1), 3472. <https://doi.org/10.1186/s12889-024-20983-y>
- Zheng, Y., Miyamoto, D. T., Wittner, B. S., Sullivan, J. P., Aceto, N., Jordan, N. V., Yu, M., Karabacak, N. M., Comaills, V., Morris, R., Desai, R., Desai, N., Emmons, E., Milner, J. D., Lee, R. J., Wu, C. L., Sequist, L. V., Haas, W., Ting, D. T., ... Haber, D. A. (2017). Expression of β -globin by cancer cells promotes cell survival during blood-borne dissemination. *Nature Communications*, 8, 14344. <https://doi.org/10.1038/ncomms14344>