

## DETEKSI PEMBAWA B-THALASSEMIA DI YOGYAKARTA BERDASARKAN FRAGILITAS SEL DARAH MERAH

**Farida Noor Irfani**

Program Studi Sarjana Terapan Teknologi Laboratorium Medis  
Fakultas Ilmu Kesehatan, Universitas 'Aisyiyah Yogyakarta  
faridairfani@unisayogya.ac.id

### ABSTRAK

$\beta$ -Thalassemia merupakan suatu kelainan genetik yang bersifat hereditas dengan prevalensi tinggi di Asia Tenggara. Di Indonesia, diperkirakan sejumlah 200.000 bayi pembawa thalassemia lahir setiap tahun sehingga diperlukan upaya deteksi dini yang sederhana, cepat, dan murah. NESTROFT (*Naked Eye Single Tube Red Cell Osmotic Fragility Test*) sebagai metode deteksi berdasarkan fragilitas sel darah merah memiliki sensitivitas uji pada *carrier*  $\beta$ -thalassemia sebesar 99,8%. Oleh karena itu, pengembangan metode tersebut untuk deteksi pembawa  $\beta$ -Thalassemia di populasi Indonesia perlu dikembangkan. Penelitian dilakukan secara eksperimental menggunakan 102 sampel individu dewasa. Dilakukan uji NESTROFT dengan mencampurkan sampel uji dalam dua larutan, yakni *buffer saline* 0,36% sebagai reagen uji dan akuades steril sebagai kontrol. Hasil positif ditunjukkan dengan garis hitam pada latar belakang kertas tidak dapat dilihat secara kasat mata pada sampel uji dibandingkan kontrol akibat adanya penurunan *osmotic fragility* pada eritrosit. Selanjutnya, pemeriksaan indeks hematologis juga dilakukan sebagai data konfirmasi. Hasil penelitian menunjukkan bahwa uji NESTROFT dapat mendeteksi sebesar 88,9% dari total subyek pembawa sifat  $\beta$ -thalassemia. Hasil pemeriksaan hematologis juga menunjukkan kondisi sampel positif dengan ciri sebagai pembawa  $\beta$ -thalassemia seperti kondisi mikrositik, hipokromik, anisositosis, poikilositosis, serta nilai MCV maupun MCH rendah. Kesimpulan dari penelitian menunjukkan bahwa uji NESTROFT dapat dijadikan sebagai langkah awal diagnosis (*preliminary detection*) pembawa  $\beta$ -thalassemia yang efektif dan efisien. Selain itu, uji NESTROFT dapat digunakan pula untuk deteksi dini kelainan hemoglobin lainnya.

**Kata Kunci** :  $\beta$ -Thalassemia, Thalassemia, NESTROFT

### ABSTRACT

$\beta$ -thalassemia is a hereditary genetic disorder with a high prevalence in Southeast Asia. In Indonesia, it is estimated that 200,000 babies with thalassemia carriers are born every year, so that early detection is needed that is simple, fast, and inexpensive. NESTROFT (*Naked Eye Single Tube Red Cell Osmotic Fragility Test*) as a detection method based on red blood cell fragility has a test sensitivity of 99.8% for  $\beta$ -thalassemia carriers. Therefore, the development of this method for the detection of  $\beta$ -thalassemia carriers in the Indonesian population needs to be developed. The study was conducted experimentally using 102 samples of adult individuals. The NESTROFT test was performed by mixing the test sample in two solutions, namely 0.36% saline buffer as a test reagent and sterile distilled water as a control. A positive result is indicated by a black line on the paper background that cannot be seen with the naked eye in the test sample compared to the control due to a decrease in the osmotic fragility of erythrocytes. Furthermore, examination of the hematological index was also carried out as confirmatory data. The results showed that the NESTROFT test could detect 88.9% of the total subjects carrying  $\beta$ -thalassemia trait. Hematological examination results also showed positive sample conditions with characteristics as carriers of  $\beta$ -thalassemia such as microcytic, hypochromic, anisocytosis, poikilocytosis, and low MCV and MCH values. The conclusion of the study shows that the NESTROFT test can be used as an effective and efficient first step in the diagnosis (*preliminary detection*) of carriers of  $\beta$ -thalassemia. In addition, the NESTROFT test can also be used for early detection of other hemoglobin disorders.

**Keyword** :  $\beta$ -Thalassemia, Thalassemia, NESTROFT

## PENDAHULUAN

Thalassemia merupakan suatu bentuk kelainan genetik akibat adanya mutasi pada proses sintesis rantai globin  $\alpha$  maupun  $\beta$  sehingga memunculkan ketidakseimbangan pada jumlah kedua rantai tersebut (Sundh *et al.* 2020). Apabila jumlah rantai  $\alpha$ -globin menjadi berkurang dapat memunculkan kelainan jenis  $\alpha$ -thalassemia, sedangkan bila jumlah rantai  $\beta$ -globin yang mengalami anomali maka kelainan yang muncul berupa  $\beta$ -thalassemia (Mettananda *et al.*, 2015). Hemoglobinopathi/varian Hb disebabkan oleh adanya perubahan struktur hemoglobin secara kualitatif yang sebagian besar disebabkan oleh peristiwa substitusi asam amino tunggal pada rantai  $\alpha$  atau  $\beta$ -globin, contohnya HbE.

Persebaran thalassemia maupun varian Hb semakin meningkat akibat adanya pola migrasi global serta pernikahan antar suku di berbagai belahan dunia. *World Health Organization* (WHO) menyatakan bahwa sebanyak 7% penduduk dunia mengandung gen thalassemia (Weatherfall and Clegg, 2001). Berdasarkan data statistik, jenis pembawa thalassemia yang menunjukkan prevalensi tinggi di Indonesia berupa  $\alpha$ -thalassemia *carrier* (3-20%),  $\beta$ -thalassemia *carrier* (3%), dan HbE *carrier* (1-33%) (Viprakasit *et al.*, 2009). Di Indonesia, kasus yang banyak ditemukan adalah  $\beta$ -thalassemia dan HbE.

Dewasa ini, WHO sudah melakukan berbagai upaya untuk pencegahan persebaran thalassemia dan varian Hb seperti melalui kegiatan skrining massal rutin, konseling genetik, dan diagnosis pranatal (Manglani *et al.*, 1997). Metode skrining modern pun banyak digunakan untuk mendeteksi pembawa thalassemia seperti *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC), analisis DNA dengan *Polymerase Chain Reaction* (PCR), pemeriksaan apusan darah tepi, *Free Red Cell Porphyrins Test*, dan *Dichlorophenol indophenol precipitation (DCIP) test*. Berbagai metode tersebut cenderung memerlukan biaya yang besar, waktu yang cukup lama, serta hanya dapat dilakukan oleh seseorang dengan kemampuan laboratorium yang memadai serta didukung fasilitas laboratorium yang lengkap. Di Indonesia, masih banyak daerah dengan fasilitas dan keterampilan sumber daya manusia di laboratorium yang minim. Oleh karena itu, diperlukan suatu metode alternatif untuk deteksi pembawa  $\beta$ -thalassemia yang lebih sederhana dan memiliki efektifitas yang tinggi salah satunya dengan menggunakan metode NESTROFT (*Naked Eye Single Tube Red Cell Osmotic Fragility Test*) (Mahapatra *et al.*, 2014). Uji ini pertama kali dikenalkan oleh Kattamis *et al* pada tahun 1981 (Murry *et al.*, 2003).

Prinsip NESTROFT didasarkan pada fragilitas sel darah merah (Cow *et al.*, 2005). Metode tersebut memiliki berbagai keunggulan seperti harganya yang cenderung terjangkau, mudah dilakukan, prosesnya cepat, dan objektif (Gosavi *et al.*, 2021; Safia *et al.*, 2018). Sensitivitas uji ini sebesar 99,8% untuk mendeteksi pembawa  $\beta$ -thalassemia dalam upaya menilai prevalensi sifat dari pembawa tersebut (Chakrabarti *et al.*, 2012; Piplani *et al.*, 2013). Prinsip dari uji ini adalah mengukur ketahanan dan kerapuhan dinding eritrosit dengan menggunakan larutan hipotonis. Oleh karena itu, penelitian terkait efektifitas uji NESTROFT dalam deteksi pembawa  $\beta$ -thalassemia di populasi Indonesia penting untuk dikembangkan.

## METODE

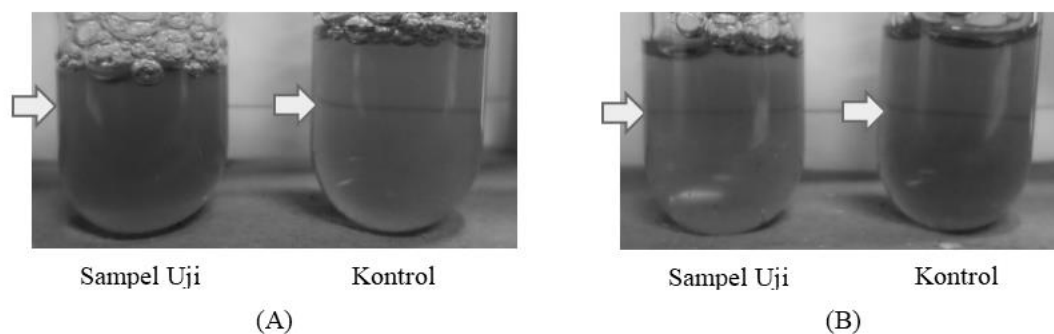
Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Genetika dan Pemuliaan, Fakultas Biologi, Universitas Gadjah Mada Yogyakarta pada bulan April-Mei 2014. Dalam pelaksanaan penelitian dilakukan kerja sama dengan klinik kesehatan PRODIA dalam agenda skrining rutin thalassemia di Yogyakarta. Adapun desain penelitian menggunakan jenis eksperimental murni (*post-test only control group*) dengan teknik pengambilan sampel berupa *accidental sampling*. Sampel uji berupa darah vena sebanyak 102 individu dewasa yang selanjutnya dilakukan pemeriksaan NESTROFT oleh peneliti dan pengecekan indeks hematologis berupa

kadar Hb, MCV, MCH, dan MCHC oleh laboratorium PRODIA sebagai acuan. Selanjutnya, hasil dari kedua uji dibandingkan untuk mengetahui efektivitas uji NESTROFT sebagai metode alternatif untuk skrining deteksi pembawa  $\beta$ -thalassemia.

Reagen yang digunakan untuk uji NESTROFT berupa 0,36% NaCl *buffer saline* yang dibuat dari larutan stok 10% NaCl dengan pH 7,4. Adapun bahan penyusunnya meliputi NaCl, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, dan NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O yang dilarutkan dalam akuades steril. Uji NESTROFT dilakukan dengan pencampuran sampel uji pada dua tube yang masing-masing berisi 0,36% NaCl *buffer saline* sebagai reagen uji dan akuades steril sebagai kontrol. Hasil positif ditunjukkan dengan tidak tampaknya garis hitam di belakang tube setelah dilakukan inkubasi selama 30 menit. Sebaliknya, hasil negatif ditunjukkan dengan garis hitam dibelakang tube yang tampak jelas teramati seperti halnya pada kontrol.

## HASIL

### Uji NESTROFT terhadap Sampel dengan Kelainan Hemoglobin dibandingkan Kontrol



**Gambar 1.** Hasil positif uji NESTROFT (A) dan hasil negatif uji NESTROFT (B). Tanda panah menunjukkan ada tidaknya kekeruhan larutan yang dapat menyebabkan garis latar menjadi terlihat atau tidak

### Data Skrining Massal Thalassemia

Hasil uji NESTROFT dibandingkan dengan data acuan dari hasil pemeriksaan indeks hematologis oleh Laboratorium PRODIA. Kasus kelainan hemoglobin dibagi dalam lima kelompok yang berbeda pada Tabel 1.

**Tabel 1.** Data Skrining Massal Thalassemia oleh Laboratorium PRODIA dan Hasil Uji NESTROFT

Kriteria Hasil Uji dari PRODIA	Jumlah Hasil Pemeriksaan			
	Pemeriksaan Indeks Hematologis		Uji NESTROFT	
	Positif	Negatif	Positif	Negatif
DD/anemia defisiensi besi, anemia penyakit kronis, pembawa sifat $\alpha$ -thalassemia atau kombinasi keseluruhan	5	0	4	1
Pembawa sifat $\beta$ -thalassemia	9	0	8	1
Pembawa sifat HbE	11	0	5	6
Pembawa sifat $\alpha$ -thalassemia jenis ringan	5	0	2	3
Kadar HbA <sub>2</sub> sangat rendah (1,6%)	1	0	1	0
Normal (negatif sebagai pembawa sifat)	0	71	14	57

thalassemia)				
Total	31	71	34	68

Berdasarkan Tabel 1, uji NESTROFT efektif mendeteksi pembawa  $\beta$ -thalassemia sebesar 88,9% dari total jumlah penderita yang terkonfirmasi melalui hasil pemeriksaan indeks hematologis. Selain itu, data di atas juga menunjukkan bahwa NESTROFT dapat digunakan untuk jenis thalassemia maupun varian hemoglobin lain dengan efektifitas uji yang cukup tinggi.

## PEMBAHASAN

### Uji NESTROFT terhadap Sampel dengan Kelainan Hemoglobin dibandingkan Kontrol

Sel darah merah penderita thalassemia resisten untuk mengalami lisis apabila ditempatkan pada larutan yang bersifat hipotonis. Oleh karena itu, prinsip dari uji NESTROFT didasarkan pada batas hipotonisitas yang menyebabkan sel darah merah dapat bertahan atau tidak pecah (lisis). Larutan *buffer saline* yang digunakan pada uji NESTROFT memiliki konsentrasi ion dan tingkat osmolalitas menyerupai kondisi tubuh manusia. Penggunaan *buffer saline* 0,36% telah melalui penelitian pendahuluan yang hasilnya menunjukkan bahwa nilai tersebut merupakan konsentrasi optimum yang dapat melisis sel normal, tetapi tidak melisis sel abnormal. Pada penelitian ini, akuades steril digunakan sebagai kontrol karena sifatnya jauh lebih hipotonis dibandingkan *buffer saline* 0,36% sehingga dapat dipastikan bahwa sel normal maupun abnormal apabila ditempatkan didalamnya akan mengalami lisis sempurna.

Hasil uji NESTROFT dinyatakan positif apabila garis hitam pada latar belakang kertas tidak dapat dilihat secara kasat mata saat dilakukan pengamatan pada tube berisi campuran *buffer saline* dan sampel darah uji. Hal ini dapat dibandingkan dengan garis hitam yang tampak nyata di belakang tube yang berisi campuran akuades steril dan sampel darah uji. Hasil positif uji NESTROFT mengindikasikan bahwa kerapuhan osmotik (*osmotic fragility*) sel darah merah abnormal mengalami penurunan atau dapat dikatakan ketahanan membran sel meningkat (BR, 2020; Sarda *et al.*, 2015; Shewale *et al.*, 2014). Hal ini mengakibatkan garis hitam di belakang tube tidak tampak dikarenakan sel darah merah sukar lisis sehingga larutan menjadi keruh (proses hemolisis tidak sempurna) (Gambar 1A kiri). Berbeda pada kontrol yang menunjukkan garis hitam dapat terlihat jelas dari arah depan tube (Gambar 1A kanan). Hasil uji negatif ditunjukkan apabila sampel uji berupa sel darah merah normal yang dicampurkan pada kedua reagen (*buffer saline* 0,36% maupun akuades steril) pada tube yang berbeda akan tampak garis hitam secara nyata (Gambar 1B). Hal ini disebabkan oleh kerapuhan osmotik sel darah merah uji berada pada kondisi normal sehingga di kedua larutan dapat mengalami lisis sempurna.

### Perbandingan Hasil Uji NESTROFT dan Pemeriksaan Indeks Hematologis

Pada kegiatan skrining thalassemia yang bekerja sama dengan Laboratorium PRODIA, uji NESTROFT menunjukkan bahwa metode ini cukup efektif untuk proses deteksi dan skrining  $\beta$ -thalassemia heterozigot. Hal ini mendukung penelitian Piplani *et al* (2013) yang menyatakan bahwa uji NESTROFT sangat spesifik dan sensitif untuk mendeteksi sifat  $\beta$ -thalassemia. Berdasarkan hasil penelitian dapat diketahui bahwa sebanyak 9 individu menunjukkan hasil positif sebagai pembawa  $\beta$ -thalassemia melalui tes hematologis, 8 diantaranya juga terdeteksi positif dengan menggunakan uji NESTROFT (Tabel 1). Jadi, uji NESTROFT dapat mendeteksi sebesar 88,9% dari total subyek pembawa sifat  $\beta$ -thalassemia pada penelitian ini. Satu individu positif terjangkit  $\beta$ -thalassemia namun tidak terdeteksi oleh uji NESTROFT tersebut tidak memberikan ciri khusus yang membedakannya dengan hasil uji positif lain. Ketidaksesuaian uji NESTROFT terhadap hasil pada Laboratorium PRODIA

dapat disebabkan oleh lamanya waktu inkubasi (lebih dari 30 menit) sehingga sel darah merah sudah mengalami lisis. Berdasarkan hasil tersebut, metode ini dapat dijadikan sebagai suatu tes awal diagnosis (*preliminary detection*) bagi penderita pembawa  $\beta$ -thalassemia sebelum penyelidikan lebih lanjut.

Berdasarkan data pada Tabel 1 dapat diketahui bahwa meskipun metode ini efektif untuk mendeteksi hampir 100% pembawa sifat  $\beta$ -thalassemia, tetapi dapat pula menunjukkan hasil pada kelainan hemoglobin lainnya seperti anemia defisiensi besi (Fe), pembawa sifat  $\alpha$ -thalassemia, HbE, dan pembawa sifat HbS. Oleh karena itu, penelitian terkait efektifitas uji NESTROFT dalam deteksi kelainan hemoglobin yang lainnya perlu untuk dikembangkan. Sebagai contoh, anemia defisiensi besi disebabkan oleh kekurangan cadangan besi di dalam tubuh, sedangkan anemia penyakit kronis ditandai oleh adanya kelainan metabolisme besi sehingga mengakibatkan penumpukan di makrofag. Uji NESTROFT dapat memunculkan hasil positif berkaitan dengan ciri abnormal yang ditunjukkan oleh sel darah merah yang mengalami lisis dini. Jadi, siklus umur hidup sel darah merah lebih pendek yakni kurang dari 120 hari.

Hasil uji NESTROFT pada pembawa sifat  $\beta$ -thalassemia didukung oleh uji laboratorium pada indeks morfologi eritrosit. Ukuran sel darah merah cenderung mikrositik (sel berukuran lebih kecil dari normal), kadar hemoglobin menunjukkan ciri hipokromik yang ditandai oleh warna darah yang memudar akibat konsentrasi hemoglobin yang rendah, bentuk eritrosit tampak berukuran tidak seragam (anisositosis), dan memiliki bentuk bermacam-macam seperti sel cigar atau sel pensil (poikilositosis). Nilai MCV dan MCH pun cenderung lebih rendah dari normalnya. Hal tersebut menunjukkan bahwa ukuran atau volume eritrosit yang semakin kecil menyebabkan daya tampung hemoglobin semakin berkurang.

## KESIMPULAN

Uji NESTROFT (*Naked Eye Single Tube Red Cell Osmotic Fragility Test*) dapat dijadikan sebagai metode alternatif untuk skrining deteksi pembawa  $\beta$ -thalassemia secara efektif dan efisien. Metode ini dapat dijadikan sebagai langkah awal diagnosis pembawa  $\beta$ -thalassemia (*preliminary detection*) untuk selanjutnya diberikan penanganan lebih lanjut. Uji NESTROFT dapat digunakan pula untuk deteksi kelainan hemoglobin lainnya sehingga penelitian lanjutan perlu dikembangkan.

## UCAPAN TERIMAKASIH

Terima kasih kepada dosen tercinta, Dr. Niken Satuti Nur Handayani, M.Sc atas segala ilmu dan bimbingan kepada peneliti. Terima kasih kepada Yayasan Thalassemia Indonesia/Persatuan Orang Tua Penyandang Thalassemia Indonesia (YTI/POPTI) cabang Yogyakarta, Laboratorium Klinik Prodia, Laboratorium Genetika dan Pemuliaan Fakultas Biologi Universitas Gadjah Mada, serta Universitas 'Aisyiyah Yogyakarta atas segala bantuan yang diberikan.

## DAFTAR PUSTAKA

- BR, P. (2020) 'Naked Eye Single Tube Red Cell Osmotic Fragility Test (NESTROFT)-A Brief Review', *Saudi Journal of Pathology and Microbiology*, 05(05), pp. 230–232. <https://doi.org/10.36348/sjpm.2020.v05i05.001>
- Chakrabarti, I., Sinha, S.K., Ghosh, N., and Goswami, BK. (2012) 'Beta-Thalassemia Carrier Detection by NESTROFT: An Answer in Rural Scenario?', *Iranian Journal of Pathology*, 7 (1), pp. 19-26.



- Chow, B.J., Phaelan, L., and Bain, B. (2005) 'Evaluation of Single-Tube Osmotic Fragility as a Screening Test for Thalassemia', *American Journal of Hematology*, 79(3), pp. 198-201. <https://doi.org/10.1002/ajh.20387>
- Gosavi, M., Chavan, R., and Bellad, M.B. (2021) 'NESTROFT—A Cost-Effective Mass Screening Tool for the Detection of  $\beta$ -Thalassemia Carrier Status in Anemic Pregnant Women: A Step Toward Reducing the National Disease Burden', *Journal of Laboratory Physicians*, 13(04), pp. 368–373. <https://doi.org/10.1055/s-0041-1732493>
- Mettananda, S., Gibbson, R.J., and Higgs, D.R. (2015) 'Alpha-Globin as a Molecular Target in The Treatment of Beta Thalassemia', *Blood*, 125(24), pp. 3694-3701. <https://doi.org/10.1182/blood-2015-03-633594>
- Mohapatra, R., Warang, P., Ghosh, K., and Colah, R. (2016) 'Hemoglobinopathy Screening by Osmotic Fragility Test Based on Flow Cytometer or Naked Eye', *Cytometry Part B- linical Cytometry*, 90(3), pp. 279–284. <https://doi.org/10.1002/cyto.b.21205>
- Murry, B., Sachdeva, M. P., and Kalla, A.K. (2003) 'Incidence of NESTROFT- ositives and Haemoglobin S Among the Lotha Nagas of Nagaland', *The Anthropologist*, 5(1), pp. 61–63. <https://doi.org/10.1080/09720073.2003.11890780>
- Piplani, S., Manan, R., Lalit, M., Manjari, M., Bhasin, T., and Bawa, J. (2013) 'NESTROFT: A Valuable, Cost Effective Screening Test for Beta Thalassemia Trait in North Indian Punjabi Population', *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, 7 (12), pp. 2784-2787. <https://doi.org/10.7860/JCDR/2013/6834.3759>
- Sadhu, D., Dager, V., Professor, A., and Professor, A. (2014) 'Study of Effectiveness of NESTROFT and Solubility Test as a Screening Test for the Detection of Haemoglobin Disorder at Nanded Region of Maharashtra', *International Journal of Health Sciences & Research (Www.Ijhsr.Org)*, 4(9), p. 49.
- Safia, R., Jairajpuri, Z. S., Khetrapal, S., Hassan, M. J., Gupta, M., and Jetley, S. (2018) 'An Analysis of NESTROFT and Red Cell Indices in Evaluating Antenatal Mothers for Beta Thalassemia Trait', *Bangladesh Journal of Medical Science*, 17(3), pp. 411–416. <https://doi.org/10.3329/bjms.v17i3.36996>
- Sarda, H., Niveditha, S. R., and Shivlingaiah, N. (2015) 'Screening of  $\beta$ -Thalassemia Trait among Pregnant Women with NESTROFT', *Thalassemia Reports*, 5(1), p. 4430. <https://doi.org/10.4081/thal.2015.4430>
- Sundh, A., Kaur, P., Palta, A., and Kaur, G. (2020) 'Utility of Screening Tools to Differentiate Beta Thalassemia Trait and Iron-Deficiency Anemia-Do They Serve A Purpose in Blood Donors?', *Blood Research*, 55(3), pp. 169–174. <https://doi.org/10.5045/br.2020.2020219>
- Viprakit V, Lee-Lee, C., Chong, Q.T., Lin, K.H., and Khuhapinant, A. (2009) 'Iron Chelation Therapy in The Management of Thalassemia: The Asian Perspectives', *Int J Hematol*, 90(4), pp. 435- 450. <https://doi.org/10.1007/s12185-009-0432-0>
- Weatherall, D.J. and Clegg, J.B. (2001) 'Inherited Haemoglobin Disorders: An Increasing Global Health Problem', *Bulletin of the World Health Organization*, 79(8), pp: 704-712