



UNIVERSITAS INDONESIA

**AKTIVITAS ELASTASE, LAKTASE DAN EKSPRESI
HEPSIDIN PADA TALASEMIA MAYOR DENGAN
HEMOKROMATOSIS SEBAGAI PETANDA
GANGGUAN SISTEM PENCERNAAN**

DISERTASI

Untuk memperoleh gelar Doktor dalam Bidang Ilmu Kedokteran
pada Universitas Indonesia di Jakarta di bawah
pimpinan Rektor Universitas Indonesia
Profesor Dr. der. Soc. Gumilar Rusliwa Somantri.
Untuk dipertahankan di hadapan Senat Akademik Universitas Indonesia
pada hari Rabu tanggal 14 November 2007, pukul 10.00 WIB

INA SUSIANTI TIMAN

**PROGRAM STUDI ILMU KEDOKTERAN
FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS INDONESIA
JAKARTA
2007**

PROMOTOR

Prof. Dr. dr. Agus Firmansyah, Sp.A(K)
Guru Besar Tetap Ilmu Kesehatan Anak
Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia

KOPROMOTOR I

Prof. dr. Siti Boedina Kresno, Sp.PK(K)
Guru Besar Tetap Ilmu Patologi Klinik
Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia

KOPROMOTOR II

Prof. Dr. dr. Soenardi Moeslichan Marzuki, Sp.A(K)
Guru Besar Tetap Ilmu Kesehatan Anak
Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia

TIM PENGUJI

- Ketua** : Prof. Dr. dr. Sarwono Waspadji, Sp.PD-KEMD
Guru Besar Tetap Ilmu Penyakit Dalam
Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia
- Anggota** : Prof. Dr. dr. Agus Firmansyah, Sp.A(K)
Guru Besar Tetap Ilmu Kesehatan Anak
Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia
- Prof. dr. Siti Boedina Kresno, Sp.PK(K)
Guru Besar Tetap Patologi Klinik
Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia
- Prof. Dr. dr. Soenardi Moeslichan Marzuki, Sp.A(K)
Guru Besar Tetap Ilmu Kesehatan Anak
Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia
- Prof. Dr. dr. Daldiyono Hardjodisastro, Sp.PD-KGEH
Guru Besar Tetap Ilmu Penyakit Dalam
Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia
- Prof. Dr. dr. Rianto Seliabudy, SpFK
Guru Besar Tetap Ilmu Farmakologi
Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia
- Dr. dr. Nani Dharmasetiawani, Sp.A
SMF Anak RSIA Budi Kemuliaan

UCAPAN TERIMA KASIH

Puji syukur saya panjatkan ke hadirat Tuhan Yang Maha Esa atas segala rahmat dan karuniaNya yang telah dilimpahkan kepada kami sekeluarga sehingga memungkinkan saya menyelesaikan disertasi ini. Perkenankanlah saya dengan rendah hati dan setulus-tulusnya untuk menyampaikan ucapan terima kasih yang sedalam-dalamnya kepada :

Promotor saya, Prof. Dr. dr. Agus Firmansyah, Sp.A(K) yang saya hormati yang telah mendorong saya untuk mengikuti pendidikan ini, selalu memberi semangat dan dorongan serta petunjuk secara sistematis, bimbingan yang tulus dan tak kenal lelah dan pengarahan selama menjalani pendidikan, penelitian dan penulisan disertasi ini. Terima kasih juga atas waktu yang selalu diuangkan untuk saya diada-ada kesibukan beliau, tanpa bimbingannya tak mungkin saya menyelesaikan disertasi ini.

Ko Promotor saya Prof. dr. Siti Boedina Kromo, Sp.PK(K) yang saya hormati yang sejak lama telah mendorong saya untuk mengikuti pendidikan ini dan selalu siap membantu dan memberi semangat serta petunjuk untuk berpikir secara sistematis dan kritis selama menjalani pendidikan, penelitian dan penulisan disertasi ini. Terima kasih juga untuk waktu yang selalu diberikan pada saya dalam penulisan dan penyusunan disertasi ini hingga selesai, tanpa dukungan beliau tak mungkin saya menyelesaikan penulisan ini.

Ko Promotor saya Prof. Dr. dr. Soenardi Moedichan Marzuki, Sp.A(K) yang saya hormati yang telah memperkenalkan saya dengan sisi lain talasemia, yang selalu memberi semangat dan dorongan serta bimbingan selama menjalani pendidikan, penelitian dan penulisan disertasi ini. Tanpa bimbingan dan bantuan beliau tak mungkin disertasi ini dapat terlaksana.

Pembimbing dan penguji saya, Prof. Dr. dr. Daldiyono Hardjodisastro., Sp.PD-KGEH yang saya hormati yang selalu bersedia berbagi pengalaman, memberi semangat dan dorongan serta bimbingan selama menjalani pendidikan, penelitian dan penulisan disertasi ini.

Pembimbing dan penguji saya, Prof. Dr. dr. Rianto Senabady, Sp.FK yang saya hormati yang selalu memberi petunjuk, semangat dan dorongan serta

bimbingan untuk mengatasi kesulitan yang timbul selama menjalani pendidikan penelitian dan penulisan disertasi ini.

Pembimbing dan penguji saya, Dr. dr. Nani Dharmasetiawati, Sp.A, pembimbing saya yang saya hormati yang telah memperlakukan saya sebagai pemeriksa kromatografi, selalu memberi semangat dan dorongan pada setiap hambatan yang saya temui serta bimbingan selama melakukan penelitian dan penulisan disertasi ini.

Prof. Dr. dr. Sarwono Waspadi, Sp.PD-KEMD, selaku Ketua Program Studi Pascasarjana S-3 Bidang Kedokteran Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, yang juga menjadi Ketua Tim Penguji dan Penilai disertasi, yang dengan tekun selalu memberi semangat dan dorongan serta asipon agar saya dapat menyelesaikan disertasi ini. Terima kasih juga saya ucapkan kepada Prof. Dr. dr. Agus Firmansyah, Sp.A(K) Ketua Program Studi Pascasarjana S-5 Bidang Kedokteran Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia terdahulu, yang telah memberikan kesempatan bimbingan serta dorongan untuk mengikuti pendidikan, menyelesaikan penelitian dan disertasi saya, Dr. dr. Feriadi Hadipoetro Idris, Sp.RM, M.Kes, SPS Program Studi S-3-Kedokteran, atas segala bantuannya.

Profesor Dr. dr. Soe. Gumilar Rudiwa Somarini, Rektor Universitas Indonesia yang telah memberikan kesempatan melakukan penelitian dan menyelesaikan disertasi saya di Universitas Indonesia. Juga kepada Prof. dr. Usman Chath Wana, Ph.D., Sp.MK, Rektor Universitas Indonesia terdahulu, yang telah memberikan kesempatan kepada saya untuk dapat menjalani pendidikan, penelitian dan menyelesaikan disertasi ini.

Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, dr. Menaldi Ramit, Sp.PJK, FCCP, beserta wakil Dekan Prof. Dr. dr. Siti Aminah Boediarja, Sp.KKOK dan dr. Prijo Sidipratomo, Sp.Rad, yang telah memberikan kesempatan kepada saya untuk mengikuti pendidikan dan menyelesaikan disertasi ini. Juga kepada Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia terdahulu, Prof. dr. Ali Sulaiman, Sp.PD-KGEH, Ph.D., yang telah memberikan kesempatan pada saya untuk mengikuti pendidikan ini dan menyelesaikan penelitian saya.

Prof. Dr. dr. Akmal Taber, Sp.U(K), Direktur Utama RS Dr. Cipto Mangunkusumo, beserta para Wakil Direktur, yang telah memberikan peluang

pada saya untuk melakukan penelitian di lingkungan RSCM. Terima kasih juga saya ucapkan kepada dr. Merdian Almatier, Sp.S(K), direktur RSCM terdahulu beserta para Wakil Direktur, yang telah memperkenalkan saya melakukan penelitian di lingkungan RSCM.

Dr. dr. Rastadi Soesumihardjo, DMM, MS, Sp.PK(K), Ketua Departemen Patologi Klinik Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, yang telah memberikan kesempatan kepada saya untuk mengikuti pendidikan dan menyelesaikan disertasi ini. Begitu pula kepada dr. Sison Kurnatidar, Sp.PK(K), Ketua Departemen Patologi Klinik terdahulu yang telah mengizinkan saya mengikuti pendidikan dan penelitian ini.

dr. Alida R. Harahap, Sp.PK, Ph.D., yang telah membimbing dan memberikan dorongan serta kesempatan pada saya untuk melakukan penelitian di lingkungan Lembaga Biologi Molekular Eijkman. Kepada Prof. dr. Sangkot Marzuki, Ph.D., D.Sc. yang telah memberikan saya kesempatan untuk meneliti di lingkungan Lembaga Biologi Molekular Eijkman untuk menyelesaikan disertasi ini. Kepada Dr. Soham Ari W. Saityagraha, yang telah banyak membantu saya dalam melakukan penelitian ini.

Prof. Dr. Johannes J.M. Muis, J. Henry van Katz-Renaud, Prof. Dr. Jan Verhoeff, Niki A Georgiou Ph.D. from Eijkman-Winsler Center University Medical Center Utrecht, Netherlanda. Allow me to extend my utmost thanks from the deepest part of my heart, for all your help in analyzing the Non Transferrin Bound Iron and all your concern about my research. Without you all, the completion of this research would not be possible. Hartelijke dank.

Dr. Yuliana Harahap, MS, Ketua Laboratorium Bioavailabilitas dan Bioekivalensi (BABEL) Departemen Farmasi Fakultas MIPA Universitas Indonesia terdahulu, yang telah membimbing saya dalam bidang kromatografi, dan telah memperkenalkan saya untuk melakukan penelitian di lingkungan Laboratorium BABEL Fakultas Farmasi Universitas Indonesia. Juga kepada Drs. Harianto SE., MKM, Ketua Laboratorium BABEL beserta stafnya, Krisnasari Giangpratama, SFarm, Apt., Mahi Wulandari, SFarm, Apt., Theresia Sisrandang, SFarm, Apt., Rina Rahmawati, SFarm, Apt. yang telah membantu saya dalam melakukan penelitian di bidang kromatografi. Terima kasih juga saya ucapkan

kepada Dr. Maimun Radji, M.Biomed, Kepala Departemen Farmasi Fakultas MIPA Universitas Indonesia yang telah memperkenalkan saya untuk melakukan penelitian di lingkungan Laboratorium BADE.

Prof. dr. H. Arwin AP Akib, Sp.A(K), Kepala Departemen Ilmu Kesehatan Anak FKUI-RSCM beserta seluruh staf, yang telah mengajukan saya untuk melakukan penelitian di lingkungan Departemen Ilmu Kesehatan Anak Prof. dr. Djajatinan Ganot Sp.A(K), Kepala Divisi Hematologi Onkologi Departemen Ilmu Kesehatan Anak FKUI-RSCM beserta seluruh staf, Prof. Dr. dr. Iskandar Wahidiyat, Sp.A(K) Kepala Pusat Talasemia dan, dr. Amalia Puatika, Sp.A(K), Pelaksana Harian Pusat Talasemia RSCM beserta seluruh staf telah mengizinkan saya untuk bekerja dan meneliti di Pusat Talasemia tersebut, terima kasih atas bantuan, dukungan dan kerjasamanya sehingga penelitian ini dapat saya selesaikan.

Prof. Dr. dr. Agus Firmansyah Sp.A(K), Kepala Divisi Gastrohepatologi Departemen Ilmu Kesehatan Anak FKUI-RSCM beserta seluruh staf yang telah mengizinkan saya untuk bekerja dan meneliti di lingkungan Gastroenterologi Departemen Ilmu Kesehatan Anak. Terima kasih atas bantuan, dukungan dan kerjasamanya sehingga penelitian ini dapat saya selesaikan. Tanpa bantuan beliau tak mungkin penelitian ini dapat terlaksana.

Dra. Metta S.S.W., MS, yang telah membantu saya dalam memahami prinsip kromatografi dan membantu saya dalam mengatasi kesulitan-kesulitan yang saya jumpai dalam bidang kromatografi. Bapak Samud Arifin, SKM, yang telah membantu saya memberikan arahan dalam pengolahan statistik data saya. Dr. dr. Saptawati Barlosone, MSc, yang telah membantu saya dalam bidang gizi untuk mengetahui status gizi anak dengan talasemia.

Terima kasih juga kepada Prof.dr. Riadi Wirawan, Sp.PK(K) Koordinator Penelitian terdahulu, guru saya, yang telah memperkenalkan saya dengan ilmu Patologi Klinik di bidang Hematologi umumnya dan talasemia khususnya, yang selalu mendorong dan memberikan bantuan pada saya untuk mengikuti pendidikan ini serta menyelesaikan disertasi ini. Prof.dr. Rahayuningsih Dharma, Sp.PK(K), DSc, guru saya, yang telah mendorong saya untuk bergabung di bidang

Patologi Klinik, yang selalu memberikan dorongan pada saya untuk mengikuti pendidikan ini serta menyelesaikan disertasi ini.

Terima kasih juga saya ucapkan kepada para guru dan senior saya yaitu : Prof. Dr. Ratwita Gandascebrata, Sp.PK (alm), Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia terdahulu, yang telah menerima saya menjadi staf di Bagian Patologi Klinik, dan banyak membimbing saya di bidang hematologi; ProCdr. Jeanne Latu, SpPK (alm), Kepala Bagian Patologi Klinik terdahulu, yang telah menerima saya menjadi staf, dr. Olga Kong Tjoan Nio, SpPK (alm) dan dr. Surya Sodikin, SpPK (alm), dr. Simon Kunnandar, SpPK(K), Dr.dr. Rustadi Soeromahardjo, SpPK(K), DMM, Prof.dr. Marzuki Suryaatmadja, SpPK(K), dr. Frans S. Saedi, SpPK(K), dr. Ailda R. Harshap, SpPK(K), PhD, dr. Dalima Astrawinata, SpPK(K), dr. Farida Getman, SpPK(K), dr. Erwin Silman, SpPK (alm), Prof.dr. Suzanna Immanuel, SpPK(K), dr. Tonny Lobo, SpPK(K), dr. Diana Aulia, SpPK(K) Kepala Laboratorium Hematologi terdahulu, yang telah mendorong dan banyak membantu saya selama pendidikan, dalam melakukan penelitian dan penyelesaian disertasi ini. Terima kasih untuk semua dorongan, bimbingan serta bantuan yang telah diberikan kepada saya selama ini. Tanpa bantuan dan dorongan itu tidak mungkin saya dapat menyelesaikan penelitian dan penyelesaian disertasi ini.

Terima kasih juga saya ucapkan kepada teman-teman saya : dr. July Kumalawaty, SpPK(K), dr. Indika Pitro, Sp.PK, Dra. Itawati Pratanata, MSc, dr. Elly Santoso, SpPK, dr. Nini Sukartini, SpPK, dr. Yusra, SpPK, dr. Dewi, SpPK, dr. Petriana, dr. Sri Adhyanti, dr. Nuri, SpPK, dr. Adrian SpPK, dr. Astuti, SpPK, yang telah meluangkan waktu untuk membantu saya dalam menyelesaikan pekerjaan saya yang tertunda karena kesibukan saya dalam menyelesaikan disertasi ini. Terima kasih kepada seluruh PPDS di Departemen Patologi Klinik yang selalu siap membantu dan atas pengertiannya untuk kesibukan saya selama melakukan penelitian ini. Terima kasih juga saya ucapkan kepada para teknisi, perawat dan karyawan baik di Patologi Klinik, Pusat Talasemia, Hematologi Ilmu Kesehatan Anak, Gastroenterologi Ilmu Kesehatan anak, yang telah banyak membantu saya untuk menyelesaikan penelitian saya : Zr. Hapsah, Zr. Haryati, Ibu Eti, Sdr. Dewi, Sdr. Eko, Ibu Linda, Ibu Titin, Sdr. Awi, Ibu Eta, Sdr.

Azzizar, Sdr. Widodo, Sdr. Sutiyo, Sdr. Restu, Sdr. Ila, Sdr. Sei Wahyuni, Sdr. Vera, Ibu Mawarnis, Ibu Sulastri, Sdr. Yuli, Sdr. Suyono, Sdr. Roomina, Sdr. Nana, Sdr. Arodah serta semua karyawan Patologi Klinik lain yang tak dapat saya sebutkan namanya satu persatu.

Terima kasih kepada para Staf Pelaksana Sekretariat Program Studi Doktor FKUI, Ibu Linda, Sdr. MA. Syaefudin, S.Sos, Sdr. Ubaydillah atas bantuan dan kerjasamanya. Terimakasih juga saya ucapkan kepada seluruh responden penderita talasemia beserta keluarganya atas kesediaan dan pengertian dan kesabarannya. Semoga dukungan Ibu dan Bapak sekalian dapat memberikan manfaat bagi dunia Ilmu Pengetahuan dan Kemanusiaan. Terima kasih kepada Bapak Bella, Ibu Putri, Ibu Mega, Bapak Andre, Bapak Robert Tampubolon dan Bapak Paulus atas dukungannya dalam membantu penelitian ini.

Rasa terima kasih, cinta dan hormat saya sampaikan pada ke dua orang tua saya, ayah saya almarhum dr. D. Timan dan ibu saya dr. Theresia S. Timan, Sp.KK yang dengan kasih sayangnya telah membesarkan dan mendidik saya, yang senantiasa memberikan bimbingan serta bantuan, dan sejak saya kecil telah menanamkan nilai-nilai luhur dan memberikan panutan dalam kehidupan. Telah mendorong saya dalam menuntut ilmu sejak jenjang pertama hingga saat ini, selalu menolong saya dalam kesibukan saya. Tanpa dukungan, bantuan dan dorongan mereka tak mungkin saya mencapai semua ini. Semoga apa yang telah saya capai saat ini dapat membahagiakan mereka, terutama ibu saya yang degan tanpa lelah selalu membantu saya. Dan selalu saya panjatkan untuk almarhum ayah saya, semoga dapat beristirahat dengan tenang disini-Nya.

Terima kasih saya ucapkan kepada kedua mertua saya, Almarhum Bapak Eddy Sutanto dan Almarhumah Ibu Lilly Laura, yang selalu menyanggah serta mendorong saya untuk mengikuti pendidikan dan membantu saya dalam kesibukan saya. Juga ucapkan terima kasih saya sampaikan kepada adik saya Sudjono dan Lanny serta kakak ipar saya Maria, Haryati (adm) dan Harry, yang juga mendorong dan membantu saya di tengah kesibukan saya.

Kepada seluruh keluarga saya yang telah kehilangan banyak waktu berharga karena pendidikan saya ini. Kepada pendamping hidup saya, suami saya dr. Anji Sutanto, Sp.PD, terima kasih karena telah mengizinkan saya mengikuti

pendidikan ini, senantiasa sabar dan selalu membantu saya dalam kesulitan-kesulitan yang saya hadapi, memberikan saran dalam penulisan disertasi ini dan selalu mendukung saya. Terima kasih juga kepada anak-anak saya, Aditya Pratama BS, Eliza Rama dan Natalia Rania, yang selalu siap membantu saya selama pendidikan dan dalam penyelesaian disertasi ini. Telah banyak waktu untuk kebersamaan yang hilang selama melakukan penelitian dan penulisan disertasi ini. Saya banyak belajar dari mereka untuk teknis penggunaan komputer dalam penulisan disertasi ini. Semoga Tuhan Yang Maha Kuasa dan Maha Pengasih melimpahkan Rahmat dan kurniaNya kepada kami sekeluarga.

Akhirnya dengan rasa syukur yang mendalam-dalamnya dan doa kepada Yang Maha Kuasa saya berharap agar dilimpahkan segala rahmat dan kurniaNya kepada semua yang telah membantu saya dalam menyelesaikan disertasi ini.

Jakarta, 14 November 2007

Ira S. Timan

DAFTAR ISI

	Halaman
Ucapan terima kasih	i
Daftar isi	viii
Daftar tabel	xii
Daftar gambar	xiii
Daftar lampiran	xiv
Daftar singkatan	xv
Abstrak	xvii
Abstract	xviii
BAB I. PENDAHULUAN	
1.1. Latar Belakang	1
1.1.1. Epidemiologi talasemia	1
1.1.2. Mekanisme terjadinya hemokromatosis pada talasemia	2
1.1.3. Hemokromatosis di saluran cerna	3
1.1.4. Gangguan pertumbuhan pada talasemia	5
1.1.5. Pemeriksaan laboratorium untuk mendeteksi gangguan fungsi usus dan pankreas	
1.1.6. Besi dan heparidin	6
1.2. Rumusan Masalah	7
1.3. Tujuan Penelitian	9
1.3.1. Tujuan Umum	9
1.3.2. Tujuan Khusus	9
1.4. Hipotesis	9
1.5. Manfaat penelitian	10
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA	
2.1. Talasemia	11
2.1.1. Prevalensi	12
2.1.2. Struktur hemoglobin	12
2.1.3. Dasar molekular talasemia	15
2.1.4. Talasemia beta	15
2.1.5. Patofisiologi talasemia β	17
2.1.5.1. Penyebab terjadinya eritropoiesis inefektif	18
2.1.5.2. Gangguan berbagai organ pada talasemia	20
2.1.6. Gejala klinis dan laboratorik talasemia β	21
2.1.7. Kelainan laboratorium dan diagnosis	23
2.1.8. Terapi talasemia	25
2.2. Proses digestif dan absorpsi di saluran cerna	26
2.2.1. Perkembangan saluran cerna	26

2.2.2. Peran umu halus pada pencernaan	29
2.2.3. Proses digestif dan absorpsi nutrisi	31
2.2.3.1. Proses digestif dan absorpsi karbohidrat	32
2.2.3.2. Proses digestif dan absorpsi protein	33
2.2.3.3. Proses digestif dan absorpsi lemak	33
2.2.4. Disakaridase	34
2.2.4.1. <i>Lactase-phlorizin hydrolase (LPH)</i>	35
2.2.4.2. <i>Sukrase-isomaltase (SI)</i>	40
2.2.4.3. <i>Maltase-glukoamilase (MG)</i>	42
2.2.4.4. <i>Trehalase</i>	42
2.3. Metabolisme besi	43
2.3.1. Jumlah besi tubuh	43
2.3.2. Proses absorpsi besi di enterosit	45
2.3.3. Proses homeostasis besi	47
2.3.4. Transferrin	50
2.3.5. Heposidin	53
2.4. Hemokromatosis	61
2.4.1. Hemokromatosis herediter	61
2.4.2. Kelebihan besi sekunder	62
2.4.3. Efek kelebihan besi terhadap sel	65
2.4.4. Kelebihan besi dan inflamasi	66
2.5. Pankreas dan fungsinya dalam pencernaan	67
2.6. Kerangka Teci	70
2.7. Kerangka Kemot	72

BAB III. METODOLOGI PENELITIAN

3.1. Desain	73
3.2. Tempat dan waktu penelitian	73
3.3. Populasi penelitian dan pengambilan sampel	73
3.4. Penelitian pendahuluan	74
3.4.1. Penelitian pendahuluan untuk elastase	74
3.4.2. Penelitian pendahuluan untuk laktase	74
3.4.3. Penelitian pendahuluan korelasi antara besi dan NIBI terhadap elastase dan laktase	74
3.5. Estimasi besar sampel	75
3.5.1. Perhitungan untuk elastase	75
3.5.2. Perhitungan untuk laktase	75
3.5.3. Perhitungan untuk uji korelasi: antara masing-masing antara transferrin dan NIBI terhadap elastase dan laktase	75
3.5.3.1. Perhitungan untuk uji korelasi: antara transferrin dan elastase	77
3.5.3.2. Perhitungan untuk uji korelasi: antara transferrin dan laktase	78
3.5.3.3. Perhitungan untuk uji korelasi: antara NIBI terhadap Elastase	78
3.5.3.4. Perhitungan untuk uji korelasi: antara masing-	

	NTBI terhadap laktase	78
3.6.	Kriteria inklusi dan eksklusi	78
3.6.1.	Kriteria inklusi	78
3.6.2.	Kriteria eksklusi	79
3.7.	Pengelompokan subyek	79
3.8.	Alat penelitian	80
3.9.	Cara kerja	81
3.10.	Prosedur pemeriksaan laboratorium	82
3.10.1.	Pemeriksaan elastase 1 pankreas di tinja	83
3.10.2.	Pemeriksaan aktivitas laktase	84
3.10.3.	Pemeriksaan hepsidin	85
3.10.4.	Pemeriksaan <i>New Transferrin Bound Iron (NTBI)</i>	86
3.11.	Batasan operasional	87
3.12.	Analisis statistik	88
3.1.3.	Etika penelitian	88

BAHIV. HASIL PENELITIAN

4.1.	Subyek penelitian	89
4.2.	Pemeriksaan parameter laboratorium lain	92
4.3.	Penetapan kadar elastase 1 pankreas dalam tinja (E-1)	93
4.3.1.	Pemeriksaan pendahuluan untuk E1	93
4.3.2.	Penetapan nilai elastase 1 pankreas (E1)	94
4.4.	Penetapan kadar laktosa laktulosa urin untuk perhitungan aktivitas laktase	95
4.4.1.	Validasi pemeriksaan laktosa laktulosa	95
4.4.2.	Penentuan nilai rujukan untuk laktase	97
4.4.3.	Penentuan proporsi kelainan laktase dan estimasi besar sampel pada penderita talasemia tanpa hemokromatosis	97
4.4.4.	Hasil perhitungan aktivitas laktase	98
4.5.	Penetapan hepsidin dan parameter besi tubuh lain	102
4.5.1.	Penetapan hepsidin serum	102
4.5.2.	Penetapan saturasi transferrin serum	103
4.5.3.	Penetapan ferritin serum	104
4.5.4.	Penetapan NTBI serum	105
4.6.	Korelasi antara saturasi transferrin dan NTBI terhadap fungsi pencernaan	108
4.6.1.	Penghitungan ulang estimasi besar sampel	108
4.6.2.	Korelasi antara saturasi transferrin dan NTBI terhadap fungsi pencernaan	108
4.6.3.	Korelasi antara ekspresi hepsidin terhadap fungsi pencernaan	109
4.7.	Korelasi hepsidin dengan status besi tubuh dan sitropoietin	110
4.8.	Model untuk prediksi ekspresi hepsidin	111
4.9.	Hubungan hepsidin dengan infeksi	111
4.10.	Korelasi antara besi tubuh dengan transferrin darah	112

BAB V. PEMBAHASAN	114
5.1. Karakteristik subyek penelitian	116
5.2. Karakteristik pemeriksaan laboratorium penunjang lain	119
5.3. Pemeriksaan pendahuluan pada kelompok subyek sehat	119
5.4. Pemeriksaan fungsi pankreas	119
5.4.1. Pemeriksaan elastase 1 pankreas (E1)	122
5.4.2. Pemeriksaan fungsi endokrin pankreas	122
5.5. Pemeriksaan fungsi dan integritas usus halus	122
5.5.1. Pemeriksaan enzim laktase dan integritas usus halus	125
5.5.2. Pemeriksaan laktase pada penderita hemokromatosis	126
5.5.3. Pemeriksaan laktase dengan pembandingan kelompok sehat	128
5.6. Korelasi saturasi transferrin dan NTBI dengan elastase dan laktosa laktolosa (laktase)	128
5.7. Ekspresi hepsidin pada talasemia	129
5.7.1. Ekspresi hepsidin pada hemokromatosis	133
5.7.2. Pengaruh jumlah besi tubuh dan eritropoiesis terhadap hepsidin	134
5.7.3. Hepsidin dan inflamasi - infeksi	134
5.8. Status besi tubuh pada talasemia	134
5.8.1. Status besi tubuh pada talasemia dengan hemokromatosis	136
5.8.2. Status besi tubuh dan transfusi darah	137
5.9. Penerapan hasil penelitian	137
5.9.1. Penerapan untuk sistem gastrointestinal	139
5.9.2. Penerapan untuk pencegahan hemokromatosis	139
5.9.3. Prediksi kenaikan besi tubuh pada transfusi	139
BAB VI. SIMPULAN DAN SARAN	
6.1. Simpulan	141
6.2. Temuan tambahan	142
6.3. Saran	144
Ringkasan	145
Summary	151
Daftar Pustaka	156

DAFTAR TABEL

Tabel		Judul
Tabel 2.1.	Tahap perkembangan hemoglobin manusia	15
Tabel 3.1.	Korelasi awal saturasi transferin dan NTBI terhadap elastase dan laktase	77
Tabel 4.1.	Subyek penelitian	89
Tabel 4.2.	Karakteristik subjek penelitian	90
Tabel 4.3.	Hasil pemeriksaan laboratorium lain	92
Tabel 4.4.	Hasil elastase 1 pankreas dalam tinja	94
Tabel 4.5.	Hasil analisis aktivitas laktase	99
Tabel 4.6.	Perbandingan aktivitas laktase subjek sehat, talasemia dengan hemokromatosis dan kelompok kontrol tanpa hemokromatosis	100
Tabel 4.7.	Profil kadar hepsidin dan parameter besi lain	102
Tabel 4.8.	Korelasi antara parameter besi terhadap elastase dan laktase	109
Tabel 4.9.	Korelasi ekpresi hepsidin terhadap fungsi pencernaan	109
Tabel 4.10.	Hubungan hepsidin dengan status besi tubuh dan eritropoiesis	110
Tabel 4.11.	Hubungan hepsidin dengan neutrofil	112
Tabel 4.12.	Korelasi antara parameter besi dengan transfusi darah	112

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Judul	Halaman
Gambar 2.1.	Atas sebaran talasemia di dunia	13
Gambar 2.2.	Molekul hemoglobin normal	14
Gambar 2.3.	Perkembangan rantai globin sesuai usia	14
Gambar 2.4.	Pengaturan gen pembentuk rantai globin	14
Gambar 2.5.	Proses perkembangan sel epitel usus	18
Gambar 2.6.	Proses perkembangan fungsi enterosit	20
Gambar 2.7.	Laktase-LPH	26
Gambar 2.8.	Sintesis laktase di enterosit	27
Gambar 2.9.	Molekul laktosa	28
Gambar 2.10.	Siklus dan ulang besi dalam tubuh	44
Gambar 2.11.	Tyrosin pemotapan setting point untuk absorpsi besi di enterosit duodenum	46
Gambar 2.12.	Proses absorpsi dan masuknya besi ke sirkulasi	46
Gambar 2.13.	Proses masuknya besi melalui reseptor transferrin	53
Gambar 2.14.	Hepferin	54
Gambar 2.15.	Fungsi heparin di enterosit dan makrofag sebagai mediator ekspor besi ke sirkulasi	55
Gambar 2.16.	Pengaturan produksi heparin di hati	56
Gambar 2.17.	Pengaturan besi oleh heparin	58
Gambar 2.18.	Regulasi ekspresi heparin oleh heparin di basofilia enterosit	59
Gambar 2.19.	Berbagai reseptor besi pada sel mamalia	60
Gambar 2.20.	Hubungan antara jumlah cadangan besi tubuh dengan kemungkinan komplikasinya	65
Gambar 2.21.	Regulasi besi tubuh pada keadaan tanpa inflamasi dan dengan inflamasi infeksi	66
Gambar 4.1.	Kurva ROC untuk siderase	95
Gambar 4.2.	Kurva ROC aktivitas laktase	101
Gambar 4.3.	Kurva ROC heparin	103
Gambar 4.4.	Kurva ROC saturasi transferrin	104
Gambar 4.5.	Kurva ROC Ferritin	105
Gambar 4.6.	Kurva ROC NTBI	106
Gambar 4.7.	Korelasi saturasi transferrin dan NTBI	107

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Hal
Lampiran 1. Rancangan Lembar Kerja Siswa	10
Lampiran 2. Lembar pengisian penelitian dan secara Penemuan	11
Lampiran 3. Validasi penelitian melalui angket RKT	14
Lampiran 4. Penemuan penelitian untuk analisis Tesar	16
Lampiran 5. Penemuan Literasi	17
Lampiran 6. Tes dan teknik penelitian	18

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Judul
Lampiran 1. Keterangan Lolos Kaji Etik	150
Lampiran 2. Lembar penjelasan penelitian dan formulir Persetujuan	151
Lampiran 3. Validasi pemeriksaan laktase dengan KCKT	153
Lampiran 4. Pemeriksaan pendahuluan untuk estimasi besar sampel	162
Lampiran 5. Pemeriksaan laboratorium	167
Lampiran 6. Data dasar subyek penelitian	176

DAFTAR SINGKATAN

BB	berat badan
BFU	<i>Burst Forming Unit</i>
BMI	<i>Body Mass Index</i>
CFU	<i>Colony Forming Unit</i>
E 1	Elastase 1 pankreas
DCYTB	<i>Duodenal Cytochrome B</i>
DMT1	<i>Divalent Metal Transporter 1</i>
EDTA	<i>Ethylene Di Amine Acetate</i>
Fe	<i>Ferrum</i>
FFA	<i>Free Fatty Acid</i>
GLUT 5	<i>Glucose Transporter 5</i>
HAMP	<i>Human Anti Microbial Peptide</i>
Hb	Hemoglobin
HbA	Hemoglobin A
HbA2	Hemoglobin A2
HbE	Hemoglobin E
HbF	<i>Hemoglobin Fetal</i>
HbH	Hemoglobin H
HEPCIDIN	<i>Hepatic - Celin</i>
HER	Hemoglobin Eritrosit Rata-rata
HFE	<i>Hemochromatosis gene</i>
HJV	Hemojavelin
HLA	<i>Human Leucocyte Antigen</i>
HPTH	<i>Hereditary Persistent Fetal Hemoglobinemia</i>
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
ICSH	<i>International Committee for Standardization in Hematology</i>
IEF	<i>Iso Electric Focusing</i>
IL-6	Interleukin-6
IU	<i>International Unit</i>
KCKT	Kromatografi Cair Kinerja Tinggi
kDa	kilo Dalton
KHER	Konsentrasi Hemoglobin Eritrosit Rata-rata
LDH	<i>Lactic Dehydrogenase</i>
LEAP-1	<i>Liver Expressed Antimicrobial Peptide 1</i>
LLA	Lingkar Lengan Atas
LPH	<i>Lactase Phlorizin Hydrolase</i>
LPI	<i>Labile Plasma Iron</i>
MDA	Malonil Di Aldehida
MEIA	<i>Micro Particle Enzyme Immunoassay</i>
MG	Maltase Glukoamilase
Mn	Mangan
mRNA	<i>messenger RNA</i>
NIFM	<i>Non Transferrin Bound Iron</i>
RDW	<i>Red Cell Distribution Width</i>

RER	<i>Rough Endoplasmic Reticulum</i>
RES	<i>Reticulo Endothelial System</i>
SGLT 1	<i>Sodium -Glucose coTransporter 1, Sodium Dependent Hexose Transporter 1</i>
SGLT 2	<i>Sodium -Glucose coTransporter 2</i>
SGOT	<i>Serum Glutamic Oxaloacetate Transaminase</i>
SGPT	<i>Serum Glutamic Pyruvic Transaminase</i>
SI	<i>Sukrase Isomaltase</i>
SRS	<i>Smooth Endoplasmic Reticulum</i>
ST	<i>Saturasi Transferin</i>
TB	<i>Tinggi Badan</i>
TI	<i>Transferin</i>
TIR	<i>Transferin Receptor</i>
TIR2	<i>Transferin Receptor 2</i>
TFRC	<i>Transferin Receptor</i>
TIBC	<i>Total Iron Binding Capacity</i>
U	<i>Unit</i>
VER	<i>Volume Eritrosit Rata-rata</i>
Zn	<i>Zinc</i>

ABSTRAK

Permasalahan : Talasemia adalah suatu kelainan bawaan yang ditandai dengan gangguan sintesis hemoglobin akibat berkurangnya atau hilangnya pembentukannya satu atau lebih rantai globin. Pada talasemia β mayor terjadi gangguan pembentukan rantai β globin yang kemudian akan terjadi anemia berat dan peningkatan aktivitas eritropoiesis yang ineffectif. Aktivitas eritropoiesis memacu peningkatan absorpsi besi di usus sehingga akan terjadi kelebihan muatan besi tubuh. Pemberian transfusi darah berulang secara berkala mempercepat terjadinya hemokromatosis sekunder. Terjadi peningkatan besi bebas non transferin bound iron (NTBI) yang bersifat toksik dan dapat menyebabkan gangguan berbagai organ tubuh seperti jantung, hati, kelenjar endokrin dan organ pada sistem saluran cerna. Pada talasemia terjadi gangguan homeostatis besi yang diatur oleh hepsidin sebagai regulator absorpsi besi melalui erosit.

Tujuan : Menganalisis akibat hemokromatosis pada talasemia dilihat dari status NTBI dan hepsidin terhadap fungsi saluran cerna (1) Menganalisis apakah hemokromatosis dapat menurunkan penurunan aktivitas elastase-1 pankreas; (2) Menganalisis apakah hemokromatosis dapat memengaruhi gangguan aktivitas laktase; (3) Menganalisis korelasi antara saturasi transferin dengan elastase dan laktase; (4) Menganalisis korelasi antara NTBI dengan elastase dan laktase; (5) Menganalisis ekspresi hepsidin pada keadaan peningkatan eritropoiesis disertai hemokromatosis.

Metode dan cara : Penelitian ini merupakan studi *cross sectional* untuk menganalisis pengaruh kelebihan besi tubuh baik yang terikat protein (saturasi besi, ferritin) maupun besi bebas (NTBI) terhadap fungsi dan integritas usus halus dinilai dari aktivitas laktase sebagai rasio laktosa laktolosa serta fungsi pankreas yang dinilai dari elastase E-1 pankreas. Selain itu juga untuk menganalisis ekspresi hepsidin pada keadaan kelebihan besi disertai adanya anemia besi. Subjek penelitian adalah 108 penderita talasemia yang telah mendapat transfusi berulang, sebagai kontrol adalah 86 penderita talasemia yang belum mengalami hemokromatosis. Dilakukan penelitian perbandingan pada 20 subjek sehat untuk mendapatkan nilai rujukan laktase yang dihitung dari rasio laktosa laktolosa.

Hasil penelitian: Dari hasil analisis terhadap kelompok penderita talasemia dengan hemokromatosis dan kelompok penderita talasemia tanpa hemokromatosis sebagai kontrol, dijumpai adanya penurunan bermakna pada elastase E-1 pankreas kelompok hemokromatosis. Tidak dijumpai adanya perbedaan secara statistik pada aktivitas laktase kelompok hemokromatosis dan kontrol. Tetapi dijumpai adanya perbedaan aktivitas laktase dan ekspresi laktolosa pada kelompok subjek sehat dibandingkan kelompok talasemia baik dengan hemokromatosis maupun tanpa hemokromatosis. Dijumpai adanya korelasi negatif bermakna antara saturasi transferin dan NTBI terhadap elastase E-1 pankreas. Tidak dijumpai adanya korelasi bermakna antara saturasi transferin dan NTBI terhadap aktivitas laktase. Dijumpai adanya ekspresi hepsidin sebagai rasio hepsidin/ferritin yang rendah secara bermakna pada kelompok hemokromatosis, dan terdapat korelasi negatif bermakna antara rasio hepsidin/ferritin dengan parameter besi (saturasi transferin dan NTBI) dan aktivitas eritropoiesis.

Kesimpulan: Pada penderita talasemia dengan hemokromatosis terjadi insufisiensi eksokrin pankreas. Terdapat korelasi bermakna antara saturasi transferin dan NTBI dengan penurunan fungsi pankreas yang dinilai dari aktivitas elastase E-1 pankreas. Ekspresi hepsidin sebagai rasio hepsidin/ferritin secara bermakna lebih rendah pada kelompok penderita talasemia dengan hemokromatosis, tidak sesuai dengan keadaan kelebihan besi tubuh yang terjadi. Dari temuan tambahan dijumpai adanya penurunan aktivitas enzim laktase dan perubahan integritas usus halus pada penderita talasemia baik dengan atau tanpa hemokromatosis bila dibandingkan dengan kelompok subjek sehat.

Kata kunci: talasemia, hemokromatosis, saturasi transferin, ferritin, NTBI, hepsidin, elastase E-1 pankreas, laktase.

ABSTRACT

Introduction : Thalassemia is a hereditary disorder, characterized by a genetic deficiency in one or more globin chains. In β thalassemia major, the defect in the β globin chain production causes profound anemia and increase in ineffective erythropoiesis activity. Enhance iron absorption through the gastrointestinal tract and multiple life long transfusion results in secondary iron overload/ hemochromatosis, with increased in non transferrin bound iron (NTBI) and iron deposition in organs. This will cause functional impairment of the organs, such as in the heart, liver, endocrine glands and gastrointestinal organs. In thalassemia major there is also impairment of hepcidin, a peptide hormone that regulates the iron absorption through the enterocytes.

Objective : To analyze the effect of hemochromatosis in thalassemia from the NTBI and hepcidin perspective, to the gastrointestinal functions. (1) To analyze the impairment of elastase E-1 pancreas; (2) To analyze the impairment of lactase activity; (3) To analyze the correlation between transferrin saturation with elastase and lactase activity; (4) To analyze the correlation between NTBI with elastase and lactase activity; (5) To analyze the hepcidin expression in increased erythropoietic activity and hemochromatosis.

Material and methods : This is a cross sectional study to analyze the effect of increase body iron, as protein bound iron (transferrin saturation, ferritin) or free iron (NTBI) to the function and integrity of the small bowel, evaluated as the lactase activity calculated from the lactose/lactulose ratio and the function of pancreas, evaluated from the elastase E-1 activity, as well as to evaluate the hepcidin expression in iron overload with severe anemia. The subjects of this study consisted of 108 thalassemia patients with iron overload, and 85 thalassemia subjects without hemochromatosis as the control group. A preliminary study on 20 healthy subjects was performed to determine the reference range for lactase activity as calculated from the lactose/lactulose ratio.

Results : From the analysis on the thalassemia subjects with and without hemochromatosis, it was found that the elastase E-1 pancreas was significantly lower in the hemochromatosis group. There was no statistical difference in the lactase activity between the hemochromatosis and non hemochromatosis group. Significant differences were found for lactase activity and lactulose excretion between the healthy subjects group and thalassemia with and without hemochromatosis. A significant negative correlation was found between transferrin saturation and NTBI against elastase E-1 pancreas. No correlation was found between transferrin saturation and NTBI against lactase activity. Hepcidin expression as hepcidin/ferritin ratio was lower in the hemochromatosis group. There were significant negative correlation between hepcidin/ferritin to other iron parameters (transferrin saturation and NTBI) and erythropoiesis.

Conclusion : Exocrine pancreatic impairment was found in the thalassemia subjects with hemochromatosis. Significant correlation were found between transferrin saturation and NTBI to the decreasing pancreatic function as evaluated using pancreatic E-1 elastase. Hepcidin expression as hepcidin/ferritin ratio was significantly lower in the thalassemia with hemochromatosis, despite the iron overload condition, inappropriate to the high body iron concentration. From the additional findings it was shown that thalassemia subjects with or without hemochromatosis have lower lactase activity and showed impairment of the intestinal integrity compared to the healthy subjects.

Key words : thalassemia, hemochromatosis, transferrin saturation, ferritin, NTBI, hepcidin, elastase E-1 pancreas, lactase.

BAB I

PENDAHULUAN

1.1. LATAR BELAKANG

1.1.1. Epidemiologi talasemia

Talasemia adalah suatu kelainan bawaan yang ditandai dengan gangguan sintesis hemoglobin akibat berkurangnya atau hilangnya pembentukan satu atau lebih rantai globin. Talasemia merupakan kelainan genetik yang paling sering dijumpai di seluruh dunia. Talasemia dapat dijumpai pada berbagai kelompok etnik di semua belahan dunia, tetapi terutama dijumpai dalam frekuensi yang tinggi mulai dari pantai Mediteranea, Afrika, Timur Tengah, India, Burma, Asia Tenggara, Melanesia hingga di kepulauan Pasifik.^{1,2}

Diperkirakan terdapat sekitar 250 juta pembawa (*carrier*) di seluruh dunia, sekitar 3% populasi dunia (150 juta) membawa gen talasemia β , dengan sekitar 100.000-200.000 kelahiran pertahun akan menderita talasemia.¹⁻³ Talasemia β mayor juga merupakan salah satu masalah kesehatan di Indonesia. Talasemia mayor (Cooley's anemia) pertama kali dilaporkan oleh Neel, Lie-Injo dan Jo Kian Tjoo di Indonesia pada tahun 1955, dan ternyata kemudian cukup banyak dijumpai di Indonesia.^{4,5} Jumlah karier talasemia β mayor mencapai 3-10%. Dengan populasi penduduk di Indonesia yang mencapai sekitar 200 juta maka diperkirakan pertambahan penderita cukup besar.^{3,6} Frekuensi talasemia berbeda sesuai dengan kelompok, etnik dan daerah di Indonesia.⁷

1.1.2. Mekanisme terjadinya hemokromatosis pada talasemia

Pada talasemia terjadi gangguan pembentukan rantai β globin yang kemudian akan menyebabkan ketidak-seimbangan antara rantai α dan β globin. Terdapat kelebihan rantai α globin yang akan membentuk tetramer dan mengalami presipitasi di membran plexiform eritrosit sehingga terjadi keretakan membran. Keretakan ini mengakibatkan penurunan stabilitas membran dan mempercepat terjadinya apoptosis dan destruksi eritrosit di sumsum tulang dan tungkai tepi. Terjadi eritropoiesis yang ineffectif, karena mudah terjadi hemolisis eritrosit dan terjadi percepatan siklus sel yang baru.²⁴ Hal ini menyebabkan teradanya anemia yang kemudian akan menyebabkan aktivitas eritropoiesis meningkat. Penghancuran eritrosit yang abnormal juga akan mengakibatkan pembesaran limpa yang juga semakin memperberat anemia dan merangsang eritropoiesis. Aktivitas eritropoiesis akan memacu peningkatan absorpsi besi di usus sehingga akan terjadi kelebihan muatan besi tubuh. Penderita talasemia mayor pada umumnya menderita anemia berat sehingga membutuhkan transfusi darah berulang. Pemberian transfusi darah secara berkala akan lebih mempercepat terjadinya kelebihan muatan besi sehingga menimbulkan hemokromatosis sekunder.^{25,26} Dengan demikian terjadi pengendapan besi pada berbagai organ, antara lain hati, pankreas, jantung, dan saluran cerna. Hal tersebut dapat mengakibatkan perubahan fungsi dan kerusakan pada organ tersebut.^{1,11-13}

Adanya hemokromatosis dapat diketahui berdasarkan pemeriksaan klinis, laboratorium serta radiologi. Pada pemeriksaan laboratorium akan dijumpai peningkatan besi serum dengan penurunan daya ikat besi, peningkatan saturasi besi dan ferritin serum. Pemeriksaan penyaring untuk hemokromatosis adalah

dengan memeriksa saturasi besi serum, bila kadarnya lebih dari 55% pada laki-laki atau lebih dari 50% pada wanita, maka dapat disirigati adanya hemokromatosis. Begitu pula bila dijumpai kadar ferritin yang sangat meningkat lebih besar dari 1000 ug/L.¹⁶

1.1.3. Hemokromatosis di saluran cerna

Besi merupakan salah satu nutrien yang diperlukan oleh semua makhluk hidup untuk metabolismenya, akan tetapi mineral ini dapat berbahaya bagi tubuh bila terdapat dalam jumlah yang berlebih, seperti yang dijumpai pada hemokromatosis. Pada keadaan ini akan terdapat peningkatan besi bebas dalam plasma. Besi bebas (*non transferrin bound iron, NTBI* atau *labile plasma iron, LPI*) yang tidak terikat pada protein, dapat merangsang berbagai reaksi dalam berbagai sel tubuh yang akan menghasilkan oksigen radikal yang kemudian dapat merusak sel tersebut. Besi akan mengendap di semua sel tubuh, dan akan menyebabkan terjadinya kerusakan parenkim serta gangguan fungsi organ.^{15,16}

Pada hemokromatosis sekunder, yang antara lain dapat dijumpai pada penderita talasemia yang mendapat transfusi berulang, besi bebas akan terakumulasi di sel parenkim saluran cerna, antara lain hati, pankreas, dan usus halus. Adanya besi bebas yang bersifat toksik ini akan mengkatalisis terjadinya peroksidasi lipid yang dapat mengakibatkan gangguan pada membran. Pada sel usus dapat terjadi gangguan integritas mukosa usus yang dapat mengganggu transpor lemak dan makronutrien lain. Pada pankreas dapat terjadi gangguan peminoran fungsinya sebagai kelenjar eksokrin dan merusak sel β yang memproduksi insulin.¹⁷

Pankreas adalah salah satu organ yang sering mengalami perubahan akibat terjadinya kelebihan besi. Fungsi pankreas pada proses metabolisme dan

penemuan tersebut dalam fungsinya sebagai kelenjar endokrin dan fungsi lainnya. Gangguan pada fungsi endokrin terlihat sebagai gangguan pada sel β Langerhans yang akan berpengaruh pada produksi hormon insulin. Manifestasinya adalah terjadinya gangguan pada metabolisme glukosa, toleransi glukosa terganggu dan dapat mengakibatkan terjadinya diabetes mellitus. Kerusakan pada sel dengan fungsi endokrin akan timbul sebagai gangguan seperti tersebut di atas.¹⁹

Saluran usus merupakan tempat terjadinya sistem yang sangat penting dalam proses pertumbuhan dan perkembangan manusia. Proses pencernaan dimulai sejak makanan masuk ke dalam mulut dan mengalami perubahan menjadi makanan dan mengalami proses digestif dan absorpsi dengan bantuan berbagai enzim yang diproduksi saluran usus. Dalam proses digestif diperlukan juga bantuan garam empedu, ezim dan sekresi pankreas selain ezim dan sekresi lain yang diproduksi oleh usus halus.²⁰

Sel epitel usus halus mempunyai fungsi khusus dalam memproduksi ezim, zat-zat seperti ezim disakaridase dan protein pengawet untuk digestif dan absorpsi nutrisi sesuai dengan kebutuhan tubuh. Pada waktu sel usus berada dalam kript, sel tersebut akan diprogram sesuai dengan keadaan dan kebutuhan tubuh untuk nutrisi tertentu. Sel enterosit dapat beradaptasi sesuai dengan kondisi dan keadaan tubuh.^{20,21}

Pada keadaan tertentu fungsi absorpsi nutrisi dapat berubah setelah enterosit matang. Laktase merupakan salah satu ezim disakaridase yang terletak di bagian apikal pada mikrovilus. Ezim ini sangat mudah rusak dan merupakan ezim yang paling sering mengalami perubahan karena sering terpapar dengan berbagai zat dalam lumen usus. Gangguan pada integritas usus dapat menyebabkan berkurangnya kadar laktase.²² Dilaporkan juga adanya peningkatan ezim sukrose-isomaltase pada tikus dengan talasemia dan kelebihan besi.²²

1.1.4. Gangguan pertumbuhan pada talasemia

Gangguan pada proses digestif dan absorpsi dapat mengakibatkan gangguan pada proses tumbuh kembang anak. Pada anak penderita talasemia sering dijumpai adanya hambatan pertumbuhan yang dapat dilihat dari berkurangnya tinggi badan atau panjang tungkai dibanding pada anak normal.^{23,24} Pemberian nutrisi yang lebih besar dari *recommended dietary allowance* dapat memperbaiki pertumbuhannya yang dinilai dari pertambahan berat badan, tetapi tidak dapat menyasi kekurangan pada pertumbuhan tinggi badannya. Diperkirakan terjadi *stunting* akibat kurangnya nutrisi yang didapat.²⁵ Diperkirakan bahwa gangguan pertumbuhan dapat terjadi pada 8-72 % penderita talasemia di dekade kedua kehidupannya. Gangguan pertumbuhan terjadi baik pada penderita yang disertai atau tidak disertai gangguan endokrin. Gangguan pertumbuhan ini tetap terjadi meskipun penderitanya telah mendapat terapi kelasi.²⁶ Indeks masa tubuh (*Body Mass Index, BMI*) yang kurang, lebih banyak dijumpai pada anak yang berusia lebih dari 10 tahun, hal ini diperkirakan terjadi akibat adanya *undernutrition*.^{26,27} Pada penderita talasemia homozigot juga dilaporkan terjadinya perubahan komposisi mineral tubuh.²⁸

1.1.5. Pemeriksaan laboratorium untuk mendeteksi gangguan fungsi usus dan pankreas

Deteksi adanya gangguan pada fungsi endokrin pankreas dapat dilakukan dengan pemeriksaan enzim di dalam cairan aspirat duodenum, seperti amilase dan lipase. Akhir-akhir ini banyak dilaporkan penggunaan uji elastase pankreas 1 (E1) dari tinja yang digunakan sebagai penanda adanya kerusakan pada pankreas. Pemeriksaan enzim elastase tinja ini dilaporkan lebih sensitif dan spesifik

dibandingkan dengan pemeriksaan amilase dan lipase serum dalam mendeteksi dini gangguan pada fungsi pankreas.²⁶

Untuk mengetahui adanya gangguan aktivitas laktase usus dapat dilakukan dengan cara invasif seperti dengan biopsi atau dengan cara tidak langsung untuk mengetahui aktivitas digesti laktase dan absorpsinya.²⁷ Pada cara tidak langsung dapat dilakukan tes pembebanan, misalnya dengan laktosa dan laktulosa secara oral untuk kemudian diukur hasil absorpsi yang tercermin pada ekskresi karbohidrat tersebut di urin dengan menggunakan cara kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT, *High performance liquid chromatography*, HPLC).²⁸

1.1.6. Besi dan hepsidin

Akhir-akhir ini banyak diteliti peran hepsidin, suatu peptida pendek, dibentuk di hati dan berfungsi sebagai regulator negatif homeostasis besi tubuh. Peran hepsidin pada awalnya dihubungkan dengan gangguan absorpsi besi pada hemokromatosis herediter, tetapi kemudian perannya pada kelebihan besi sekunder seperti talasemia juga semakin banyak diteliti.²⁹⁻³¹ Hepsidin juga dikembangkan sebagai terapi dalam upaya menanggulangi kelebihan besi pada hemokromatosis sekunder, antara lain pada talasemia mayor.³²⁻³⁴

Sel enterosit duodenum mempunyai fungsi penting dalam pengaturan absorpsi besi sesuai dengan kebutuhan besi tubuh. Regulasi absorpsi besi tergantung aktivitas eritropoiesis dan cadangan besi tubuh. Regulator eritropoiesis mempunyai efek yang lebih dominan dibandingkan dengan regulator cadangan tubuh. Sel enterosit di kriptas akan mengalami proliferasi dan diferensiasi sehingga ketika mencapai pertengahan hingga puncak vilus sel enterosit matang tersebut akan melakukan fungsinya sesuai *setting point* yang telah dibuat di kriptas.^{35,36,37}

Pada keadaan kelebihan besi maka hepsidin, suatu hormon peptida, akan meningkat. Hal ini akan menyebabkan besi tidak dapat keluar dari enterosit dan mencegah terjadinya kelebihan besi yang lebih berat. Pada keadaan di mana tubuh sangat memerlukan besi untuk eritropoiesis maka sintesis hepsidin akan menurun sehingga absorpsi besi meningkat.^{25,26}

Hepsidin akan mempengaruhi banyaknya besi yang dapat dilepaskan di enterosit, plasenta, serta makrofag. Besi yang masuk ke plasma akan mempunyai efek umpan balik terhadap produksi hepsidin berikutnya. Untuk aktivasi hepsidin diperlukan bantuan protein HFE, yaitu suatu protein yang diproduksikan gen HFE (hemokromatosis) sebagai respons terhadap peningkatan besi plasma di sirkulasi. Pada keadaan anemia defisiensi besi/hipoksia, transkripsi hepsidin dihentikan, kadarnya dalam darah berkurang, terjadi ekspor besi dari enterosit dan makrofag ke sirkulasi.^{25,26,27}

1.2. RUMUSAN MASALAH

Pada talasemia terjadi eritropoiesis tidak efektif dan terjadi hemolisis. Hal tersebut menyebabkan peningkatan absorpsi besi dan kelebihan besi. Absorpsi besi tergantung dari regulator eritropoiesis dan cadangan besi tubuh. Terdapat suatu hormon peptida yang mengatur absorpsi besi di enterosit, yaitu hepsidin. Hingga saat ini dari telah pustaka yang dilakukan, belum banyak dijumpai adanya laporan penelitian mengenai peran hepsidin plasma pada penderita talasemia.

Pada kelebihan besi terjadi peningkatan besi bebas yaitu NTBI atau LPI. Besi bebas dapat mengendap di parenkim berbagai organ tubuh seperti hati, pankreas dan usus halus. Besi bebas tersebut dapat mengakibatkan kerusakan

membran dan integritas sel sehingga mungkin akan bermanifestasi pada gangguan fungsi organ saluran cerna. Hingga saat ini dari telaah pustaka yang dilakukan belum dijumpai adanya laporan penelitian mengenai gangguan fungsi usus halus pada penderita talasemia, maupun penelitian tentang efek hemokromatosis pada saluran cerna secara menyeluruh (usus, pankreas dan hati) pada penderita talasemia. Bisa dijumpai gangguan fungsi usus dan pankreas, pemberian enzim akan meningkatkan kemampuan pencernaan dan penyerapan nutrisi sehingga akan memperbaiki status pertumbuhan penderita talasemia. Atas dasar ini disusun pertanyaan penelitian sebagai berikut di bawah ini.

1. Apakah kelebihan besi pada talasemia yang menimbulkan peningkatan NTBI dan hemokromatosis sekunder pada pankreas dapat mengakibatkan gangguan fungsi eksokrin pankreas?
2. Apakah kelebihan besi pada talasemia yang menimbulkan peningkatan NTBI dan hemokromatosis sekunder pada usus halus dapat mengakibatkan gangguan integritas dan fungsi usus halus?
3. Apakah manifestasi gangguan fungsi saluran cerna yang terjadi mempunyai korelasi dengan status transferrin?
4. Apakah manifestasi gangguan fungsi saluran cerna yang terjadi mempunyai korelasi dengan NTBI?
5. Apakah kelebihan besi pada talasemia dan eritropoiesis aktif yang terjadi mempunyai korelasi dengan ekspresi heptidin?

1.3. TUJUAN PENELITIAN

1.3.1. Tujuan Umum

Menganalisis akibat kelebihan besi dilihat dari status NTBI dan hepsidin terhadap fungsi saluran cerna pada penderita talasemia mayor

1.3.2. Tujuan Khusus

1. Menganalisis apakah hemokromatosis pada talasemia dapat menimbulkan gangguan fungsi pankreas yang digambarkan dengan penurunan aktivitas elastase-1 pankreas dalam tinja.
2. Menganalisis apakah hemokromatosis pada talasemia dapat menimbulkan gangguan fungsi usus halus yang digambarkan dengan aktivitas laktase.
3. Menganalisis korelasi antara saturasi transferrin dengan elastase dan aktivitas laktase.
4. Menganalisis korelasi antara NTBI dengan elastase dan aktivitas laktase.
5. Menganalisis ekspresi hepsidin pada penderita talasemia, di mana terdapat peningkatan eritropoiesis yang disertai hemokromatosis.

1.4. HIPOTESIS

1. Hemokromatosis pada talasemia mengakibatkan penurunan aktivitas elastase-1 pankreas.
2. Hemokromatosis pada talasemia mengakibatkan gangguan struktur usus halus yaitu perubahan integritas usus dan penurunan aktivitas enzim laktase.
3. Terdapat korelasi yang bermakna antara kadar saturasi transferrin dengan fungsi pencernaan: makin tinggi saturasi transferrin makin berat gangguan yang terjadi.
4. Terdapat korelasi yang bermakna antara kadar NTBI dengan fungsi pencernaan: makin tinggi NTBI makin berat gangguan yang terjadi.

5. Terdapat korelasi yang bermakna antara ekspresi hepsidin dengan parameter besi lainnya.

1.5. MANFAAT PENELITIAN

1. Bagi perkembangan ilmu : memberikan data dasar dan teori baru mengenai gangguan fungsi saluran cerna dan status hepsidin pada hemokromatosis, serta memberi pemahaman lebih baik mengenai sistem homeostatis besi bagi penelitian-penelitian lanjutan.
2. Bagi penanganan penderita : dengan diketahuinya gangguan fungsi pankreas dan usus halus yang terjadi, dapat dilakukan upaya perbaikan dalam penanganan penderita baik dari segi terapi serta dietnya.
3. Bagi institusi : hasil yang diperoleh dari penelitian ini diharapkan dapat bermanfaat bagi upaya promotif dan pencegahan. Dengan intervensi yang lebih dini, mungkin gangguan organ dan pertumbuhan yang ada selama ini dapat dicegah.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. TALASEMIA

Talasemia adalah suatu kelainan bawaan yang paling sering dijumpai di dunia. Pada kelainan ini dijumpai adanya gangguan pembentukan hemoglobin akibat berkurang atau tidak dibentuknya salah satu rantai globin. Diperkirakan terdapat sekitar 269 juta *carrier* di seluruh dunia. Sekitar 3% populasi dunia (150 juta) membawa gen talasemia β , dengan sekitar 100.000-200.000 kelahiran pertahun akan menderita talasemia.^{1,2} Di Indonesia talasemia juga merupakan salah satu masalah kesehatan, dengan frekuensi *carrier* yang berkisar antara 1,5-9% penduduk, maka bila diperhitungkan dengan jumlah total penduduk Indonesia, diperkirakan akan terdapat 2000 kasus talasemia mayor yang lahir setiap tahunnya.⁷

Talasemia adalah suatu sindrom yang didasarkan oleh adanya aeti patologi dari satu atau lebih gen pembentuk globin yang diturunkan secara genetik. Talasemia diturunkan secara resesif autosom, ditandai dengan defek pada sintesis satu atau lebih rantai globin yang membentuk tetramer pada hemoglobin manusia normal. Hal ini akan menyebabkan gangguan pembentukan tetramer pada molekul hemoglobin, sehingga eritrosit menjadi mikrositik dan hipokromik, yang merupakan kelainan yang khas pada subjek dengan talasemia. Terdapat ketidak-seimbangan antara produksi berbagai rantai globin, sedangkan tidak ada mekanisme tubuh untuk mengurangi pembentukan rantai yang relatif berlebih karena tidak mempunyai pasangannya.^{1,2,8} Defek tersebut akan mengakibatkan terjadinya eritropoiesis yang inepektif serta katabolisme eritrosit di perifer yang

meningkat, dan menimbulkan pemendekan usia eritrosit dengan gambaran eritrosit mikrositik hipokrom, dan menimbulkan anemia pada penderitanya.^{1,2,4}

Talasemia pertama kali dikemukakan oleh Cooley dan Lee pada tahun 1925 pada suatu kasus anemia berat pada awal masa kehidupan dan disertai dengan splenomegali dan perubahan tulang. Setelah itu pengetahuan mengenai talasemia semakin berkembang, mulai gejala klinis hingga dasar kelainan molekularnya.^{1,4} Talasemia adalah suatu kelainan yang didasarkan pada adanya defek kuantitatif sintesis satu atau lebih rantai globin, oleh karena itu klasifikasinya didasarkan pada jenis kelainan rantai globin yang sintesisnya terganggu. Dalam kelompok besar penggolongan digolongkan menjadi talasemia α , β , γ , δ , $\delta\beta$, dan $\epsilon\gamma\delta$. Talasemia juga dapat digolongkan dalam sub kelompok menurut keadaan rantai globin, hanya dibuat sebagian atau tidak diproduksi sama sekali.^{1,2,4}

2.1.1. Prevalensi

Talasemia dapat dijumpai pada berbagai kelompok etnik di semua belahan dunia, tetapi terutama dijumpai dalam frekuensi yang tinggi di sepanjang alur di sekitar daerah tropik mulai pantai Mediteranea, Afrika, Timur Tengah, India, Burma, Asia Tenggara termasuk Indonesia, Melanesia dan di kepulauan Pasifik. Kelainan α talasemia terutama dijumpai di daerah Asia Tenggara dan Cina, juga secara sporadik di India, Kuwait, Timur Tengah, Yunani, Italia dan Eropa Utara. Di daerah Timur Saudi Arabia terlapat hingga 50% α talasemia, dan frekuensi $\beta\delta\epsilon$ di sana juga terus meningkat (Lihat gambar 2.1).^{1,2}



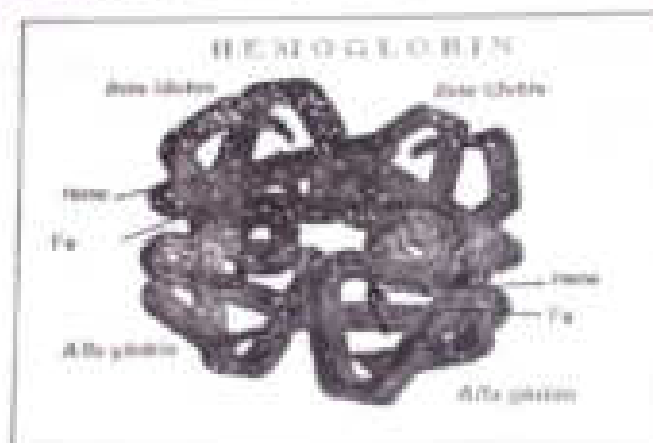
Gambar 2.1. Area sebaran talasemia di dunia.¹⁰

Dengan adanya perubahan demografi penduduk, seperti penduduk migran dari Asia telah membawa kelainan tersebut ke Amerika dan Eropa, sehingga talasemia juga menjadi masalah kesehatan di banyak negara sejalan dengan migrasi yang terjadi. Talasemia di Eropa terutama dijumpai pada penduduk di Italia dan Yunani. Di Siprus dan untuk talasemia β tercapai 1/7 penduduk, sedangkan di Sardinia masalah talasemia β homozigot mencapai 1/250 kelahiran hidup. Jenis talasemia ini juga dijumpai dalam jumlah yang lebih sedikit di Afrika barat dan utara. Di Amerika utara talasemia ini terutama mengenai penduduk dengan latar belakang Mediterania, Afrika dan Asia.¹⁴

Prevalensi talasemia β untuk Asia Tenggara adalah sekitar 5%.¹⁵ Insidensi untuk $\beta\delta/\delta$ talasemia mencapai 1/200-1/80 terutama banyak dijumpai di Asia Tenggara, terutama banyak di perbatasan Mongolia, Laos dan Kamboja hingga Sukuannya dapat mencapai 50-60%.¹ Di Indonesia, Suku Selayukan diketahui talasemia β homozigot sekitar 3-10% dan $\beta\delta$ 1-25%.¹ Saat ini hanya sekitar 200 penderita saja yang terdaftar untuk mendapat perawatan di rumah sakit.¹⁶

2.1.2. Struktur Hemoglobin

Hemoglobin adalah suatu molekul pembawa oksigen yang terdapat dalam eritrosit. Molekul hemoglobin pada manusia terdiri dari suatu tetramer dari 4 rantai globin dan heme yang terdiri dari 4 cincin porfir yang mengandung atom besi (gambar 2.2).^{1,3,4} Gangguan atau kegagalan pembentukan rantai globin maupun heme akan menyebabkan penurunan produksi hemoglobin dan bermanifestasi pada bentuk eritrosit menjadi mikrositik hipokromik. Pembentukan hemoglobin tergantung dari keseimbangan antara produksi yang seimbang dari rantai globin dan heme. Pada molekul hemoglobin normal terdapat sepasang rantai globin yang berbeda saat masa janin, bayi, anak dan masa dewasa.^{1,2,41,42}

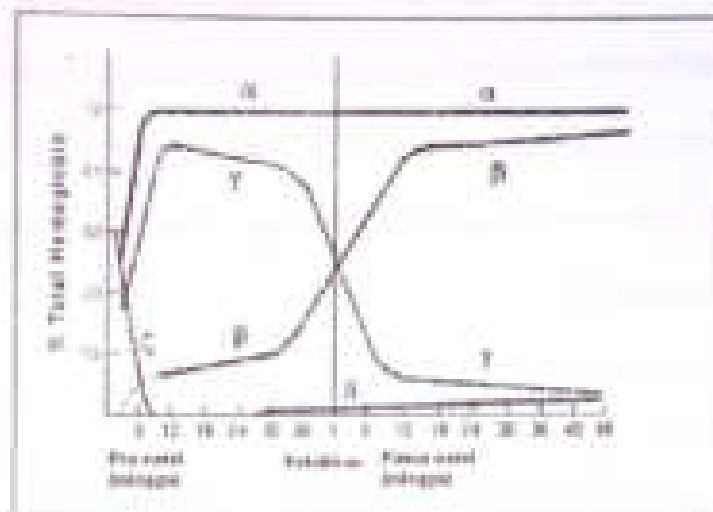


Gambar 2.1. Molekul hemoglobin normal. (Modifikasi dari Supriatna, 42)

Pada usia dewasa hemoglobin manusia terutama terdiri dari hemoglobin A, serta sedikit hemoglobin F dan hemoglobin A2. Hemoglobin A terdiri dari 2 pasang rantai polipeptida α globin dan β globin, membentuk tetramer $\alpha_2\beta_2$, hemoglobin F terdiri dari tetramer $\alpha_2\gamma_2$ sedangkan hemoglobin A2 terdiri dari $\alpha_2\delta_2$ (Matriks 2.1). Pada perkembangan awal terdapat bentuk rantai globin embrional yang juga membentuk tetramer dan membentuk hemoglobin embrional, yaitu Gower dan Portland (Lihat Gambar 2.3).^{2,43}

Tabel 2.1. Tahap perkembangan hemoglobin manusia.⁴³

Tahap perkembangan	Jenis hemoglobin	Struktur	Kadar pada orang dewasa
Embriolik	Gewar I	$\zeta_2 \alpha_2$	0
	Gewar II	$\alpha_2 \alpha_2$	0
	Portland I	$\zeta_2 \gamma_2$	0
Fetal	F	$\alpha_2 \gamma_2$	< 1%
Dewasa	A	$\alpha_2 \beta_2$	97-98%
	A2	$\alpha_2 \delta_2$	2-3%



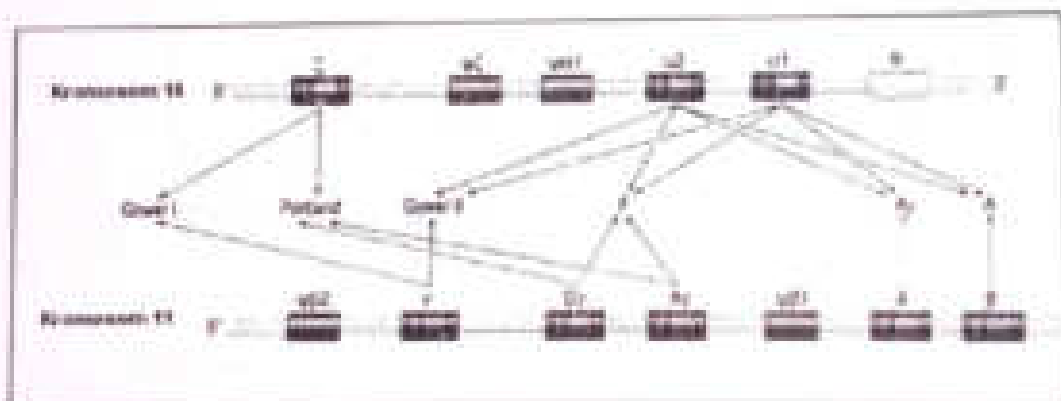
Gambar 2.3. Perkembangan rantai globin sesuai usia.⁴³

2.1.3. Dasar Molekular Talasemia

Pengaturan pembentukan rantai globin dilakukan oleh 2 buah kelompok (*cluster*) gen, yaitu α *gene cluster* yang terletak pada kromosom 16 dan β *gene cluster* pada kromosom 11. Kromosom 11 mengandung β *gene cluster* yang mempunyai satu gen β fungsional dan satu gen β fungsional, 2 gen γ fungsional dan satu gen $\psi\beta$ dan 1 gen δ . Gen ψ adalah suatu pseudogen yang tidak fungsional. Pada kromosom 16 terdapat untuk rantai globin ζ dan 2 gen α . Dua buah gen γ , yaitu γ^A , γ^G mengatur pembuatan rantai polipeptida untuk rantai yang berbeda

pada asam amino ke 136, yaitu Δ y untuk alanin dan Δ γ untuk glisin. Pada saat kelahiran perbandingan antara alanin dan glisin adalah 3 : 1, rasio ini akan berubah secara variatif setelah dewasa dan pada penderita *Hereditary Persistent Fetal Hemoglobinemia* (HPFH) (gambar 2.4).^{1,2}

Pada kromosom 11 terdapat gen untuk pengaturan rantai ϵ , γ , δ dan β . Sedangkan pada kromosom 16 terdapat gen α . Pada kromosom 16 terdapat α gene cluster dengan masing-masing 2 gen fungsional α dan ζ , serta 3 pseudogen. Daerah koding dari ke dua gen α mempunyai rangkaian nukleotida yang identik, dan mengatur pembuatan protein yang sama. Akan tetapi protein hasil transkripsinya tidak sama, hasil dari transkripsi $\alpha 2$ mRNA 3 kali lebih banyak dibandingkan $\alpha 1$ mRNA.²



Gambar 2.4. Pengaturan gen pembentuk rantai globin. Diadaptasi dari Supriatna et al

Pada talasemia dapat terjadi perubahan genetik, berupa kelainan delesi, atau non delesi tetapi tak berfungsi (non fungsional), umumnya berupa *point mutation*, di mana terjadi perubahan pada satu pasang basa pada molekul DNA sehingga mengakibatkan gangguan transkripsi, proses pembuatan, atau translasi dari mRNA globin. Delesi atau mutasi yang terjadi dapat mengakibatkan defek pada ekspresi gen sehingga mRNA atau protein yang dibentuk menjadi berkurang.

Kelainan tersebut terutama bersifat kuantitatif, tetapi sebagian kecil dapat pula disertai adanya kelainan berupa hemoglobin varian yang akan mengakibatkan terbentuknya rantai globin yang tidak stabil. Hasilnya adalah berkurang atau tidak terbentuknya satu atau lebih rantai globin.^{1,2,4)}

2.1.4. Talasemia Beta

Talasemia beta terjadi karena adanya gangguan sintesis rantai β globin. Kelainan ini juga cukup banyak dijumpai di daerah Asia Tenggara. Pada talasemia β produksi rantai beta globin dapat berkurang atau tak terbentuk dan disebut sebagai β^+ talasemia atau β^0 talasemia. Berdasarkan berat ringannya maka talasemia β digolongkan menjadi talasemia minor atau *trait*, talasemia intermedia dan talasemia mayor (*Cooley's anemia*). Pada talasemia minor terjadi gangguan atau tak terbentuknya rantai globin beta akibat kelainan pada 1 gen. Penderitanya biasanya asimtomatik dan menderita anemia mikrositik hipokrom ringan (Hb > 10 g/dL). Pada talasemia intermedia terjadi defisiensi dari kedua gen, dengan derajat anemia yang lebih berat (Hb 7-10 g/dL) meskipun penderitanya tidak selalu memerlukan transfusi darah. Pada penderita talasemia mayor terjadi gangguan berat pada kedua gen β globin, menimbulkan anemia berat yang memerlukan transfusi berulang. Di daerah Asia Tenggara terdapat talasemia dengan varian lain yaitu Hb E/talasemia β yang seringkali mempunyai gejala klinis sama beratnya dengan talasemia mayor.^{2,4)}

2.1.5. Patofisiologi Talasemia β

Talasemia merupakan suatu sindrom yang kompleks dengan kelainan intraselular yang berakibat pada gangguan pada seluruh tubuh. Berkurang atau tidak dibentuknya rantai β globin akan menyebabkan ketidak-seimbangan

produksi rantai globin dengan kelebihan rantai α , hal ini akan berakibat pada berkurangnya pembentukan hemoglobin. Pada karier akan terlihat penurunan pada hemoglobin eritrosit rata-rata (HER) dan volume eritrosit rata-rata (VER), dan menimbulkan gejala klinis yang berarti. Adanya kelebihan rantai α akan mengakibatkan eritropoiesis tidak efektif karena prekursor eritrosit akan mengalami penghancuran di sumsum tulang dan daerah ekstra medular. Hal ini khas terjadi pada talasemia β penghancuran dini dapat terjadi pada 60-75% dari total eritropoiesis. Eritrosit matang yang mengandung presipitat badan inklusi juga akan mengalami hemolisis di perifer, tetapi hal ini bukan menjadi penyebab utama terjadinya anemia pada talasemia mayor.^{2,41,43}

Kelebihan rantai α , bersama dengan sisa rantai δ dan γ sebagian kecil akan mengalami proteolisis, tetapi sebagian besar akan berada dalam prekursor eritrosit dan melekat pada membrannya dan mengakibatkan gangguan maturasi dan daya tahannya (*survival*). Beratnya gejala klinis dihubungkan dengan jumlah rantai α bebas dan ketidak-seimbangan antara rantai α dan non α pada prekursor eritrosit. Kelebihan rantai α akan menyebabkan presipitasi, hal ini pertama kali dilaporkan pada tahun 1966 oleh Fessas, dkk. dan telah dikonfirmasi kemudian dengan pemeriksaan imunologi dengan mikroskop elektron.³

2.1.5.1. Penyebab Terjadinya Eritropoiesis Tidak Efektif

Oksidasi rantai α akan membentuk hemikrom yang ireversibel, terjadi ikatan kovalen antara distal histidin E7 dengan tempat koordinasi pengikatan besi heme. Hemikrom dan rantai α yang mengalami denaturasi akan ada sepanjang masa hidup eritrosit. Hal ini mengakibatkan terjadinya gangguan struktur serta

fungsi dalam mempertahankan ketahanan, stabilitas serta hidrasiya. Protein 4.1 pada sitoskeleton membran eritrosit akan mengalami oksidasi parsial, sehingga fungsinya untuk memediasi pembentukan kompleks spektrin-protein 4.1 - aktin terganggu, dan membran menjadi kurang stabil, dan kaku. Hemikrom yang terikat membran akan berhubungan dengan *cytoplasmic domain* dari protein band 3, membentuk recanigen yang dapat mengalami opsonisasi dengan IgG autologus dan dengan adanya kompleksen akan mengakibatkan disingkirkannya eritrosit tersebut oleh makrofag.^{2,41}

Eritrosit pada talasemia β juga akan kehilangan K^+ , menyimpan Ca^{++} dan akan mengalami dehidrasi, sehingga kemampuan deformabilitasnya terganggu. Rantai α bebas juga akan mengalami degradasi, sehingga terbentuk α globin protein, heme serta besi bebas. Proses ini akan merangsang prekursor eritrosit dan membran eritrosit. Besi bebas yang terbentuk, melalui reaksi Fenton, akan menghasilkan spesies oksigen reaktif yang akan menyebabkan peroksidasi lipid dan protein, merusak organel intraschular serta membran eritrosit. Dari percobaan, penggunaan defepiron, suatu kelator besi intrasel, akan memperpanjang masa hidup eritrosit karena kemampuannya untuk mengikat besi bebas tersebut. Heme dan bentuk teroksidasinya hemin, juga menyebabkan kerusakan oksidatif terhadap berbagai komponen pada membran eritrosit dan mengakibatkan gangguan struktur serta fungsinya.^{2,41}

Perubahan di atas akan meningkatkan terjadinya apoptosis prekursor eritrosit, terutama pada stadium *polychromatophytic erythroblast*, sehingga meningkatkan terjadinya eritropoiesis infeksiif. Derajat apoptosis dapat bervariasi, dan dianggap bahwa ekspansi eritroid memegang peranan pada berat ringannya apoptosis.¹

2.1.5.2. Gangguan Berbagai Organ pada Talasemia

Terjadinya anemia akibat eritropoiesis ineffectif akan meningkatkan produksi eritropoietin, menyebabkan hiperplasia eritroid hingga 10-30 kali normal. Anemia akan menyebabkan pembesaran jantung dan gagal jantung, ekspansi eritroid akan mengakibatkan defisiensi skelet, osteoporosis dan kadang-kadang masa intra medular. Hal ini juga akan menyebabkan splenomegali, yang akan lebih memperberat anemia. Penderita talasemia, baik yang mendapat pengobatan maupun tidak, akan mengalami gangguan pertumbuhan sebagai akibat adanya anemia dan beban metabolik tubuh yang berlebih akibat ekspansi eritroid. Adanya gangguan faktor nutrisi dan infeksi akan lebih mengganggu pertumbuhan.^{1,2}

Vaskularisasi yang meningkat pada sumsum tulang mengakibatkan peningkatan volume plasma yang juga akan memperberat anemia. Eritropoiesis ineffectif akan mengakibatkan peningkatan absorpsi besi melalui usus, ditambah dengan transfusi darah yang diberikan akan menyebabkan peningkatan besi tubuh. Hal tersebut akan mengakibatkan peningkatan besi bebas tubuh, besi akan mengendap dan merusak berbagai organ seperti miokardium, hati dan kelenjar endokrin. Adanya splenomegali dan hipersplenisme mengakibatkan terjadinya trombositopenia dan neutropenia.^{3,4}

Akibat lain kerusakan membran adalah hilangnya penyebaran asimetris dan peningkatan pajanan permukaan oleh prokongan, fosfatidilserin fosfolipid dan fosfatidiletanolamin yang bermuatan negatif. Fosfolipid asimetris ini meningkatkan pembekuan trombin, dan menimbulkan aktivasi trombosit dan sel endotel. Penderita talasemia mayor dan intermedia akan mempunyai masa hidup trombosit yang lebih pendek. Adanya aktivasi trombosit kronik terlihat dari adanya

metabolit tromboksan A2 dan prostaglandin di urin. Dilaporkan juga adanya penurunan antikoagulan alami yaitu protein C dan protein S serta peningkatan kadar kompleks trombin-antitrombin dalam sirkulasi darah. Kemampuan melekatnya sel penderita talasemia ke endotel juga lebih tinggi dibanding orang normal, juga terdapat peningkatan molekul protein adhesi endotel (*intracellular adhesion molecule-1*, E-selektin, *vascular cell adhesion molecule-1*, dan *von Willebrand factor*) di plasma dan serum. Adanya aktivasi pada monosit dan granulosit memegang peran pada terjadinya kerusakan endotel dan keadaan hiperkoagulabilitas.¹⁴⁾

2.1.6. Gejala Klinis dan Laboratorik Talasemia β

Gejala klinis talasemia sangat bervariasi mulai dari tanda anemia ringan hingga berat, gangguan pertumbuhan, ikterus, pembesaran limpa, timbulnya gangguan pada tulang dan gigi hingga fraktur patologis, batu saluran empedu serta ketergantungan pada transfusi serum hidupnya. Pada bayi baru lahir hemoglobin yang dominan adalah HbF yang terdiri dari rantai globin α dan γ , sedangkan pada orang dewasa hemoglobin utamanya adalah HbA, yang terdiri dari rantai globin α dan β .¹⁴⁾

Bentuk talasemia berkisar dari talasemia β mayor, yang tergantung dari transfusi, talasemia β intermedia yang tidak memerlukan transfusi dan talasemia minor yang merupakan bentuk heterozigot yang asimtomatik. Bentuk *silent carrier* disebut sebagai talasemia minima.¹²⁾

Gejala klinis¹²⁾

1. Anemia : Gejala timbul pada tahun awal kehidupan pada saat rantai γ mulai berkurang. Dari penelitian di Inggris, anemia timbul saat bayi berusia rata-rata

6 bulan, sedang di Yunani pada usia 13,1 bulan. Gejala tergantung dari defek molekular yang terjadi dan pengobatan yang dilakukan sebelumnya. Bayi tampak pucat, diikuti dengan timbulnya splenomegali, demam dan *failure to thrive*.

2. Deformitas tulang: Penderita yang tidak ditransfusi akan mengalami deformitas tulang karena peningkatan eritropoiesis sebesar 10-30 kali normal. Tulang tengkorak membesar, deformasi di daerah frontal dan posterior, terdapat penipisan lapisan luar dan dalam tulang dengan bentuk trabekula seperti striasi membentuk gambaran *hair on end*. *Overtgrowth maxilla* menyebabkan maloklusi dan *rodentlike appearance*. Kelainan juga dijumpai di tulang metatarsal, metakarpal, iga, vertebra dan penunjang tulang panjang. Adanya eritropoiesis ekstramedular menyebabkan tonjolan di daerah yang ada sumsum merahnya. Gambaran ini banyak dijumpai pada talasemia intermedia tanpa transfusi. Bentuk tulang akan membaik bila penderita mendapat transfusi. Penderita dengan terapi deferoxamin berlebih akan memberikan gambaran lesi tulang yang berbeda.²³
3. Osteoporosis: Dijumpai penurunan densitas tulang dan rentan terhadap terjadinya fraktur. Osteoporosis dijumpai pada 61% penderita talasemia, dan 45% mengalami osteopenia. Pembentukan tulang normal tetapi resorpsinya meningkat. Terdapat mineralisasi tulang yang tak merata. Rasa sakit pada tulang disebabkan oleh adanya ekspansi sumsum tulang. Terapi yang diberikan termasuk salah hormon, olahraga, diet tinggi kalsium dan vitamin D, dan dipertimbangkan pemberian hormon paratiroid serta senyawa bisfosonat. Dijumpai juga perubahan komposisi beberapa mineral tubuh.²³

4. Kolelitiasis: Batu empedu dapat dijumpai pada 4-23% penderita talasemia. Hal ini tergantung dari derajat hemolisis, transfusi, dan saat splenektomi. Diperlukan pemeriksaan ultrasonografi berkala pada penderitanya, mungkin perlu dipertimbangkan dilakukannya kolelitektomi bersamaan dengan splenektomi.
5. Komplikasi trombotik: Dalam tahun-tahun terakhir dijumpai adanya komplikasi tromboembolik dengan prevalensi 4% pada penderita talasemia minor dan 10% pada talasemia mayor. Dijumpai adanya keadaan hiperkoagulabel pada anak. Pada penderita talasemia mayor dan intermedia dijumpai adanya pajanan dari prokoagulan fosfolipid dipermukaan eritrosit dan trombosit, dan terdapat aktivasi sistem hemostasis. Juga dilaporkan adanya kerusakan endotel pembuluh darah, dan timbulnya keadaan protrombotik pada awal dekade pertama.
6. Pseudoeksistensi elastikum: terdapat kalsium pada jaringan elastik, mengenai daerah mata, kulit dan vaskular. Onsetnya setelah dekade kedua kehidupan.
7. Gangguan fungsi ginjal dan gut sekunder: dapat dijumpai adanya hiperurisemia.⁴⁸

Pada anak dengan talasemia dijumpai gangguan pertumbuhan berupa berkurangnya tinggi badan dan berat badan. Bila diberikan nutrisi cukup, sekitar 20% di atas batas yang direkomendasi maka tinggi badan mula-mula akan membaik tetapi tetap lebih rendah dibanding kelompok anak normal, sedangkan berat badan akan bertambah menyerupai normal. Peningkatan berat terutama disebabkan penambahan lemak tubuh.²⁹

2.1.7. Kelainan Laboratorium dan Diagnosis

Sesuai dengan anjuran *International Committee for Standardization in Hematology (ICSH)* pada tahun 1975, pemeriksaan laboratorium yang diperiksa

pada penderita talasemia umumnya meliputi hematologi lengkap termasuk retikulosit disertai elektroforesis dan analisis hemoglobin. Untuk mengetahui mutasi yang ada dilakukan analisis gen.¹

Pada pemeriksaan hematologi lengkap, karakteristik yang sering dijumpai adalah penurunan kadar hemoglobin hingga 2-3 g/dL dan penurunan hematokrit, tetapi disertai peningkatan jumlah eritrosit. Pada pemeriksaan sedimen hapus didapatkan gambaran eritrosit yang mikrositik hipokrom, anisopoikilositoma, polikromasia, sering dijumpai titik basofil (*basophilic stippling*), eritrosit berinti, skistosit, *tear drop cell* dan sel target. Dengan menggunakan alat hitung sel darah otomatis dapat dilihat adanya penurunan VER, bila dijumpai nilai VER < 67 fL dapat diduga adanya talasemia. Tidak dijumpai adanya peningkatan nilai variasi ukuran eritrosit (*Red cell distribution width*, RDW). Hal ini digunakan untuk membedakan antara defisiensi besi dengan talasemia. Pada defisiensi besi terdapat juga penurunan VER, tetapi disertai peningkatan RDW. Jumlah eritrosit cukup atau meningkat, hitung retikulosit bervariasi biasanya < 10% dan ini mencerminkan aktivitas eritropoiesis maksimum tulang. Pada sumsum tulang dijumpai aktivitas eritropoiesis hiperaktif.^{1,2}

Hasil pemeriksaan elektroforesis hemoglobin dapat bervariasi, pada keadaan ringan dapat hanya dijumpai peningkatan HbA₂ saja pada talasemia *trait*, sedangkan peningkatan HbA₂ dan HbF serta penurunan HbA dijumpai pada bentuk yang lebih berat. Untuk memastikan adanya talasemia perlu dilakukan pemeriksaan laboratorium lanjutan, antara lain pemeriksaan dengan *iso electric focusing* (IEF) atau HPLC (*high performance liquid chromatography*), analisis hemoglobin varian, serta status besi tubuh yang dilihat dari kadar feritin serta

saturasi transferin, serta pemeriksaan DNA untuk mencari mutasi yang ada. Pada keadaan di mana status besi tubuh normal maka adanya peningkatan kadar HbA₂ (4-6%) atau dan disertai peningkatan kadar HbF (5-20%) pada analisis hemoglobin (Hb) akan menunjang diagnosis adanya talasemia. Sedangkan pada keadaan kekurangan besi maka seringkali dijumpai kadar HbA₂ yang normal sehingga dapat mempersulit diagnosis. Selain itu pada talasemia trait seringkali peningkatan HbA₂ dan atau HbF yang timbul juga tidak mencolok sehingga mempersulit untuk menegakkan diagnosis talasemia. Pada talasemia mayor kadar hemoglobin dapat sangat rendah sehingga penderitanya harus mendapatkan transfusi secara berkala.^{2,3}

Pemeriksaan laboratorium untuk memisahkan hemoglobin adalah secara elektroforesis pada pH alkali atau asam, *isoelectric focusing* serta *high performance liquid chromatography*. Pada penderita yang mendapat transfusi dapat dilakukan analisis rantai globin dari retikulosit di darah tepi untuk melihat ketidakseimbangan produksi rantai α/β non α (ratio >2), atau dengan analisis gen β untuk mendeteksi mutasi.^{2,3}

2.1.8. Terapi Talasemia

Terapi pada penderita talasemia mayor atau berat adalah transfusi berulang hingga kadar Hb mencapai > 9 g/dL untuk mencegah deformitas tulang. Umumnya dilakukan transfusi sebanyak 1-2 unit darah setiap bulan. Hiperplenisme yang terjadi akan merupakan tempat utama hemolitik ekstra vaskular. Pada keadaan di mana kekerapan transfusi bertambah maka dilakukan splenektomi. Pada penderita, terutama yang mendapat transfusi berulang, seharusnya dilakukan tindakan kelasi dengan deferoxamin untuk mencegah terjadinya penambunan

besi.^{34,41} Pemberian terapi kelasi dapat mengurangi terjadinya deposit besi dipermukaan eritrosit sehingga dapat memperpanjang usia eritrosit.⁴² Pada penderita yang mempunyai donor dengan HLA identik, dapat dipertimbangkan untuk dilakukan transplantasi sumsum tulang. Dianjurkan untuk melakukan konsultasi genetik pada pasangan yang menderita talasemia.^{33,43}

2.2. PROSES DIGESTIF DAN ABSORPSI DI SALURAN CERNA

2.2.1. Perkembangan saluran cerna

Dalam perkembangannya pada janin, usus halus berasal dari *foregut* (usus depan), *midgut* (usus tengah) dan *hindgut* (usus belakang). Bagian *foregut* yang akan menjadi bagian bukal mulut, faringa, esofagus, lambung dan proksimal duodenum, diperdarahi oleh *caeliac axis*. Bagian *midgut* yang akan menjadi duodenum distalis, jejunum, ileum, sekum, apendiks dan kolon proksimal, mendapat aliran darah dari arteri *Meenterika Superior*. *Hindgut* akan berkembang menjadi kolon distalis dan rektum, diperdarahi oleh arteri *Meenterika Inferior*. Kelenjar saliva, hati dan kandung empedu serta pankreas merupakan bagian dari pertumbuhan *foregut* dan *midgut*.^{33,44}

Perkembangan saluran cerna terbagi dalam 6 tahap. Tahap pertama adalah organogenesis, tahap selanjutnya adalah pembentukan diskus embrionik dan fase pembentukan arsitektural epitel. Tahap ketiga adalah diferensiasi epitel dan mesotel, dilanjutkan dengan maturasi dan persiapan untuk berfungsinya saluran cerna ekstrasterin. Tahap kelima adalah fase neonatal pasca kelahiran, untuk adaptasi saluran cerna, dan tahap terakhir adalah periode penyapihan, merupakan masa transisi antara pemberian nutrisi susu dengan diet padat. Saluran cerna akan mulai tampak sejak masa kehamilan 4 minggu, sebagai saluran sepanjang 4 mm

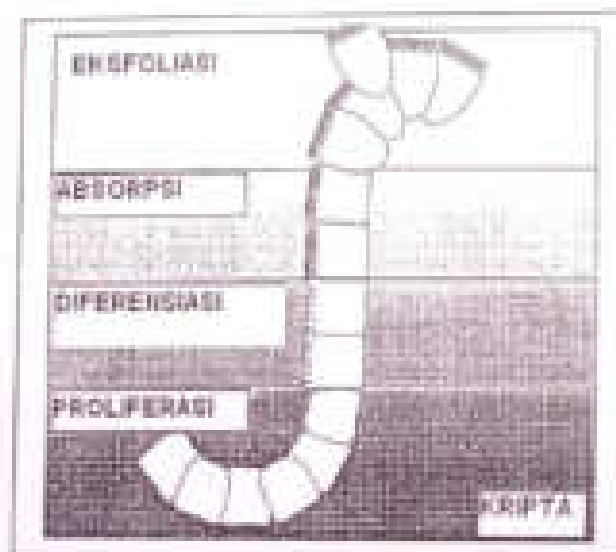
dari mulut ke kloaka. Kemudian akan berkembang hingga 100 kali panjangnya pada saat akhir kehamilan (panjangnya 3-7 kali panjang badan dengan usus kecil yang 5 kali lebih panjang dari kolon). Perkembangan meliputi proliferasi sel, pertumbuhan ukuran serta berat organ.^{15,16,17}

Pankreas mulai terbentuk pada minggu ke 4 kehamilan dari 2 divertikula dari foregut, yaitu bagian dorsal yang akan berkembang menjadi bagian terbesar pankreas serta bagian ventral yang akan membentuk prosesus uncinatus dan kaput pankreas. Pada minggu ke 6 mulai tampak duktus Wirsung dan Santorini, dan pada minggu ke 7 sudah tampak pankreas. Pada minggu ke 20 sudah ada butir zimogen di dalam sel asiner. Usus kecil berkembang dari midgut, pada minggu ke 4 sudah dijumpai duodenum yang berhubungan dengan gaster, pankreas, hati dan sekum. Pada minggu ke 20 seluruh saluran cerna sudah tampak bentuknya. Bagian endoderm dan mesoderm di sekitarnya berkembang menjadi lapisan epitel mukosa, submukosa, lapisan muskularis serta serosa. Jaringan mukosa usus halus ini terdiri dari sel enterosit yang terletak di atas membran basalis yang memisahkannya dari lamina propria.^{18,19,20}

Lapisan mukosa terdiri dari lapisan epitel kolonner. Vilus terbentuk pada minggu ke 9 kehamilan, kripta pada minggu 10-11, berada di antara vilus. Pada minggu 10-12 tampak mikrovilus, deposit glikogen, kompleks Golgi dan mitokondria, lisosom, vesikel dan korpuskel tampak pada bagian apikal sitoplasma enterosit. Kelenjar enteriendokrin dan Goblet tampak pada minggu 9-10, kelenjar Brunner tampak pada minggu ke 14-15 dan pada minggu 16 tampak sel Tuff yang fungsinya belum jelas. Di antara enterosit ileum akan dijumpai sel M dengan kelompok sel limfosit (minggu 16-18) yang akan timbul bersamaan dengan

Peyer's Patches. Lapisan subepitelium, lamina propria dan bagian luar saluran cerna berasal dari mesenkim. Kontrol proliferasi dan diferensiasi mukosa tampak pada minggu ke 4 gestasi, dipengaruhi interaksi antara sel mesenkim dan epitel. Limfosit pada minggu ke 12 sudah dapat beraksi terhadap mitogen, limfopotesis timbul pada minggu ke 15. Lapisan muskularis mukosa terbentuk dari agregat sel mesenkim di sekitar dasar kripa pada minggu 17-20. Terjadi pertukaran/ regenerasi yang sangat cepat pada sel usus halus, dengan siklus regenerasi sekitar 3-5 hari. Pada saat tersebut juga terjadi perkembangan kelenjar pankreas dan hati.⁴⁷

Lapisan mukosa berasal dari selapis epitel dan kemudian bermitosis dan berkembang menjadi epitel silindris, termasuk dalam bentuk vilus dan intervilus. Kripa terbentuk melalui penetrasi sel epitel ke dalam mesenkim yang terletak di bawahnya. Dalam perkembangannya akan terbentuk tonjolan-tonjolan pada mukosa yang dilapisi oleh sel epitel disebut vilus dan lapisan brush border pada permukaan epitel yang menghadap ke lumen yaitu mikrovilus. Adanya lipatan-lipatan pada mukosa ini akan membuat permukaan usus halus menjadi sangat luas hingga 600 kalinya.



Gambar 2.5 : Proses perkembangan sel epitel usus. Dikutip dari Supriatna, 20

Di antara vilus terdapat kriptas dengan kedalaman sepertiga vilus. Pada kriptas terdapat sel stem yang akan berproliferasi menjadi sel progenitor dan berproliferasi serta berdiferensiasi lebih lanjut menjadi enterosit matang. Enterosit matang adalah sel epitel yang mempunyai fungsi khusus dalam absorpsi nutrisi dari lumen usus. Pada proses pematangan ini sel enterosit akan bermigrasi ke puncak vilus, dalam pertengahan perjalanannya sel sudah akan mulai berfungsi. Perjalanan ini pada orang dewasa akan memakan waktu sekitar 3-5 hari, sedangkan pada anak mungkin waktunya lebih lambat. Setelah waktunya sel akan mati dan akan mengalami ekfoliasi, dilepas ke lumen usus. Hal ini akan menyebabkan terjadinya regenerasi sel yang terus menerus (lihat gambar 2.5).^{20,21}

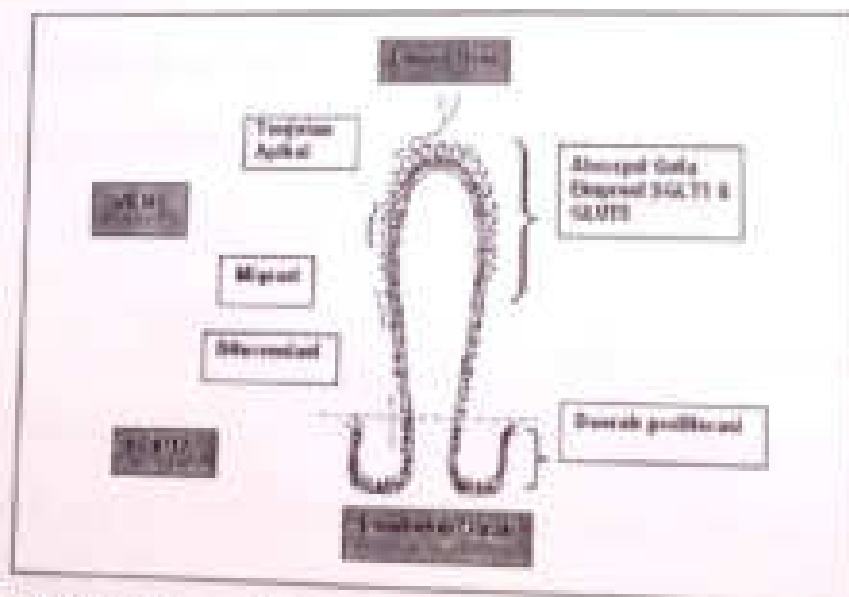
Selama proses proliferasi dan diferensiasi sel tersebut akan menjadi lebih panjang dan mulai mempunyai struktur baru serta akan dapat melakukan absorpsi nutrisi. Sebagai contoh protein transpor glukosa baik yang tergantung sodium (*Sodium dependent glucose transporter, SGLT1*) maupun yang tidak tergantung sodium (*GLUT5*) akan terbentuk pada membran brush border enterosit sejak pertengahan tinggi vilus. Jumlahnya akan mencapai maksimal pada puncak vilus. Regulasi fungsi absorpsi usus oleh tubuh berkaitan erat dengan bentuk arsitekturalnya. Enterosit merupakan sel yang paling sering mengalami pajanan dengan zat yang dapat merusaknya, baik yang berasal dari makanan maupun enzim pencernaan intralumenal.^{20,21}

2.2.2. Peran usus halus pada pencernaan

Sabana cerna mempunyai struktur lapisan yang mirip, mulai dari esofagus hingga anus, dengan beberapa variasi untuk fungsinya di setiap area. Lapisannya terdiri dari mukosa, submukosa, muskularis eksterna dan serosa. Mukosa adalah

lapisan sel yang melapisi sisi luminal, terdiri dari 3 lapisan yaitu membran epitel mukosa, lamina propria dan muskularis mukosa. Usus halus merupakan area di mana sebagian besar proses digestif dan absorpsi terjadi, terbagi menjadi 3 segmen, yaitu duodenum, jejunum dan ileum. Tidak terjadi proses digestif lagi setelah nutrisi melewati usus halus. Begitu pula dengan absorpsi, meskipun kolon dapat mengabsorpsi sejumlah cairan serta garam.¹⁸

Epitel usus halus terdiri dari 4 jenis sel yaitu sel enterosit yang berbentuk silindris, sel enteroendokrin, sel goblet dan sel Paneth. Sel tersebut berasal dari sel stem yang sama dalam kript Lieberkuhn. Sel enterosit berfungsi dalam absorpsi nutrisi, sel goblet akan menghasilkan mukus yang berfungsi sebagai pelumas dan pelindung sel lain. Sel enteroendokrin akan menghasilkan berbagai hormon yang diperlukan pada proses digestif seperti kolesistokinin, sekretin, VIP untuk mempengaruhi sekresi organ pencernaan lain. Sel Paneth berfungsi sebagai antimikroba. Sel yang melapisi vilus juga mempunyai kemampuan untuk memproduksi enzim digestif yang diperlukan untuk mencerna nutrisi serta mengandung reseptor untuk absorpsi nutrisi dan meneruskannya ke dalam sirkulasi darah (lihat gambar 2.6).^{19,20}



Gambar 2.6. Proses perkembangan fungsi enterosit. ^{19,20} (Sumber: dari hepatokan 7)

Pada waktu sel stem berada dalam kriptu, sel tersebut akan diprogram sesuai dengan keadaan dan kebutuhan tubuh untuk nutrisi tertentu.^{20,21} Enterosit akan mengandung enzim brush border yang dibutuhkan untuk melakukan pencernaan, antara lain enzim disakaridase untuk digesti disakarida menjadi monosakarida, peptidase untuk pemecahan di/tri peptida kecil menjadi asam amino serta lipase usus untuk memecah lemak menjadi gliserol dan asam lemak.¹⁸ Pada keadaan tertentu fungsi absorpsi masih dapat berubah setelah enterosit matang.²¹

2.1.3. Proses digestif dan absorpsi nutrisi

Proses digestif nutrisi dimulai sejak makanan masuk melalui mulut, terjadi penghancuran menjadi partikel yang lebih kecil dan peneupiran dengan enzim dari kelenjar ludah yang mengandung amilase untuk pemecahan amilam. Makanan kemudian diteruskan ke esofagus, lambung dan usus halus, tempat terjadinya pencernaan lebih lanjut. Proses digestif karbohidrat, protein dan lemak dilakukan oleh berbagai enzim, kemudian terjadi absorpsi zat makanan. Setelah melewati usus halus, sisa makanan kemudian akan diproses dalam usus besar, sebelum akhirnya dikeluarkan melalui anus.^{14,16}

Proses digestif karbohidrat sebagian kecil dimulai oleh amilase dan lipase yang berasal dari kelenjar saliva, akan terjadi hidrolisis polisakarida untuk menjadi molekul yang lebih kecil. Proses terjadi di mulut, lambung dan kemudian nutrisi diteruskan ke lumen usus halus. Dalam lumen duodenum amilase pankreas akan melakukan proses selanjutnya dan terbentuk poli/disakarida. Enterosit usus halus akan memproduksi enzim protease dan disakaridase yang terdiri dari α -glukosidase dan β -glukosidase. Enzim yang tergolong α -glukosidase meliputi sukrase-isomaltase (SI), maltase-glukosidase (MG), dan trehalase. Sedangkan

yang termasuk β -glukosidase adalah laktase-laktisin hidrolase (*Lactase-phlorizin hydrolase-LPH, Lactase + glycosyl-ceramidase*). Enzim-enzim tersebut berada dalam bentuk kompleks yang merupakan heterodimer.^{18,26,49}

2.2.3.1. Proses digestif dan absorpsi karbohidrat

Enterosit hanya dapat menyerap monosakarida. Amilase saliva dan pankreas menghidrolisis ikatan α 1,4 glukosa-glukosa pada amilosa dan amilopektin di lambung tetapi tak dapat memecah ikatan α 1,6 glukosa-glukosa atau bagian terminal/percabangan, α 1,4glukosa-glukosa (α limit dekstrin). Terbentuk polimer glukosa, dalam bentuk di/ri polimer (maltosa, maltotriosa). Amilase pankreas akan memecah lebih lanjut karbohidrat menjadi maltosa dan maltotriosa serta α limit dekstrin di lumen usus. Pada enterosit terdapat enzim untuk memecah oligosakarida dan disakarida menjadi monosakarida. Glikosamilase (α limit dekstrinase) akan menghidrolisis ikatan α 1,4 glukosa-glukosa, gugus isomaltase pada sukrase-isomaltase akan memecah ikatan α 1,6 dan sukrase akan membebaskan glukosa dari ikatan maltosa, maltotriosa dan dekstrin.^{19,51}

Enzim sukrase-isomaltase (SI) terbentuk dalam bentuk dimer, ada di brush border enterosit terutama jejunum. Enzim ini akan dipecah oleh protease usus menjadi sukrase dan isomaltase, dan akan memecah karbohidrat dari tanaman yaitu sukrosa (glukosa+fruktosa) dan pati (amilosa dan amilopektin) yang ada pada diet manusia setelah disapuh. Hasil hidrolisisnya adalah glukosa, fruktosa, maltosa dan maltotriosa serta dekstrin cabang.⁵² Enzim maltase-glikosamilase (MG) akan memecah maltosa, maltotriosa dan amilopektin. Laktase (LPH) akan memecah molekul laktosa (glukosa+galaktosa) dan selobiosa.^{18,26,50-54}

Sebagian besar monosakarida yang terbentuk akan diabsorpsi secara aktif melalui berbagai transporter. Glukosa dan galaktosa sebagian besar akan masuk melalui *Sodium-glucose cotransporter (SGLT1)* yang ada di puncak atau apikal *brush border*. Fruktosa akan masuk melalui transporter GLUT5 yang juga terletak di apikal *brush border*. Ketiga karbohidrat tersebut akan keluar melalui membran basolateral enterosit melalui GLUT2 dan masuk ke dalam sirkulasi portal.^{21,22}

1.2.3.2. Proses digestif dan absorpsi protein

Proses pemecahan protein dalam nutrisi dimulai oleh pepsin yang ada di lambung dengan cara hidrolisis sehingga terbentuk fragmen polipeptida. Proses digestif akan dilakukan selanjutnya oleh enzim eksokrin pancreas yaitu endopeptidase: tripsin, kimotripsin, elastase, dan eksopeptidase yaitu karboksipeptidase A dan B di lumen usus halus sehingga terbentuk polipeptida serta asam amino. Sel *brush border* enterosit usus halus juga memproduksi aminopeptidase (endo dan eksopeptidase) yang memecah ikatan pada polipeptida sehingga membentuk di/tripeptida dan asam amino yang akan diabsorpsi enterosit.^{27,28} Absorpsi terjadi melalui penggabungan (*coupling*) dengan *sodium-cotransport* pada bagian apikal enterosit. Bentuk di/tripeptida masuk melalui transpor aktif dan akan diubah menjadi asam amino oleh peptidase intraselular.²⁹

1.2.3.3. Proses digestif dan absorpsi lemak

Lipid dalam diet sebagian besar terdiri dari trigliserida, fosfolipid dan kolesterol (*ester*). Proses digestif lemak dimulai oleh enzim lipase gaster dalam jumlah kecil dan lalu sebagian besar dilanjutkan oleh enzim lipase pancreas dalam lumen usus halus. Enzim lipase gaster menghidrolisis trigliserida menjadi digliserida

dan asam lemak. Oleh gerak lambung lemak berubah menjadi molekul kecil guna memperbesar luas permukaan untuk kontak dengan enzim di usus halus.²⁸

Dalam usus halus, trigliserida, fosfolipid dan kolesterol dan hasil pemecahan lipase gaster dengan bantuan garam empedu yang diproduksi hati akan mengalami emulsifikasi menjadi *micelles*. Ko lipase dengan bantuan fosfolipase A yang disekresi pankreas akan menempel pada *micelles* agar memudahkan pemecahan selanjutnya oleh lipase pankreas menjadi monogliserida, kolesterol bebas, lekositin dan asam lemak. Asam lemak bebas rantai pendek, kolesterol dan monogliserida yang terlarut dalam *micelles* akan berdifusi secara pasif melalui membran apikal *brush border* kemudian di bawa oleh protein pengangkut *Free Fatty Acid Binding Protein*. Untuk asam lemak rantai panjang proses absorpsi akan terjadi melalui reseptor khusus.^{29,30}

1.1.4. Disakaridase

Pada *brush border* mikrovilus usus kecil terdapat berbagai glikoprotein yang berperan dalam hidrolisis dan absorpsi nutrisi, karbohidrat, protein serta lemak. Disakaridase adalah kelompok enzim yang diproduksi enterosit. Disakaridase dapat dibedakan menjadi α -glukosidase dan β -glukosidase. Melalui proses transasi, translokasi dan glikosilasi inti, enzim-enzim ini dibawa ke dalam rongga sisternal pada retikulum endoplasma kasar (*rough endoplasmic reticulum*, RER) enterosit, kemudian diangkat ke permukaan sel melalui retikulum endoplasma halus (*smooth endoplasmic reticulum*, SER) dan badan Golgi, tempat pembuatan rantai oligosakarida.^{31,32}

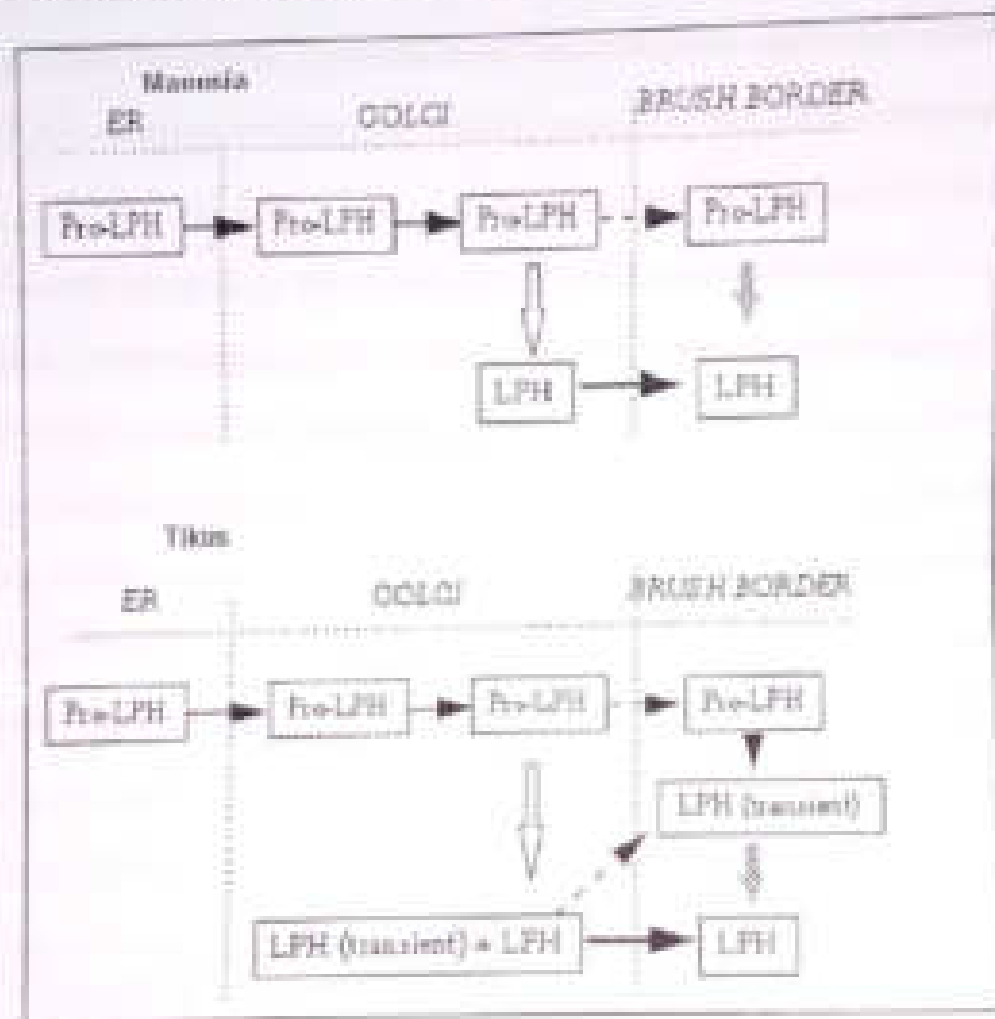
Struktur dan aktivitas disakaridase dikontrol oleh usia enterosit dan degradasi enzim intra luminal usus. Aktivitasnya rendah atau tak tampak pada sel kriptal dan kemudian timbul bersamaan dengan migrasinya ke apikal di ujung vilus. Enzim brush border ini akan terus menerus disintesis sepanjang aksis kriptal-vilus. Waktu paruhnya lebih pendek dari waktu paruh enterosit. Pada manusia disakaridase mempunyai aktivitas maksimal di pertengahan tinggi vilus. Pemanurunan aktivitas terutama sakrase dijumpai di puncak vilus, diperkirakan oleh digestif enzim pankreas.⁴⁹

Terdapat perbedaan struktur disakaridase sepanjang usus, tergantung dari siklus hidup enterosit. Lokasi proses awal sintesis dan kecepatan turnover sel akan berpengaruh pada derajat aktivitas enzim sepanjang aksis kriptal-vilus. Pada manusia laktase dan SI mempunyai aktivitas tertinggi di jejum dan aktivitasnya berkurang ke arah proksimal serta distal usus halus. MG meningkat ke arah distal ileum. Faktor yang mempengaruhi aktivitas enzim brush border adalah makanan dan hormon. Pengaruhnya terjadi melalui sintesis, derajat degradasi dan mungkin juga pengaturan strukturnya.^{49,50}

2.2.4.1. *Lactase-phlorizin hydrolase (LPH)*

LPH adalah suatu glikoprotein integral membran yang disintesis oleh sel enterosit usus halus. Merupakan suatu enzim membran pada mikrovilus yang berperan dalam menghidrolisis laktosa, karbohidrat utama susu. LPH juga mempunyai aktivitas sebagai β glukosidase. Naim pada penelitiannya berhasil membuat cDNA dari LPH. LPH diekspresikan sebagai suatu molekul rantai polipeptida tunggal (pro-LPH) yang akan ditranskan ke membran, akan dipecah oleh tripsin dengan (pankreas) Prekursor pro-LPH ini mempunyai

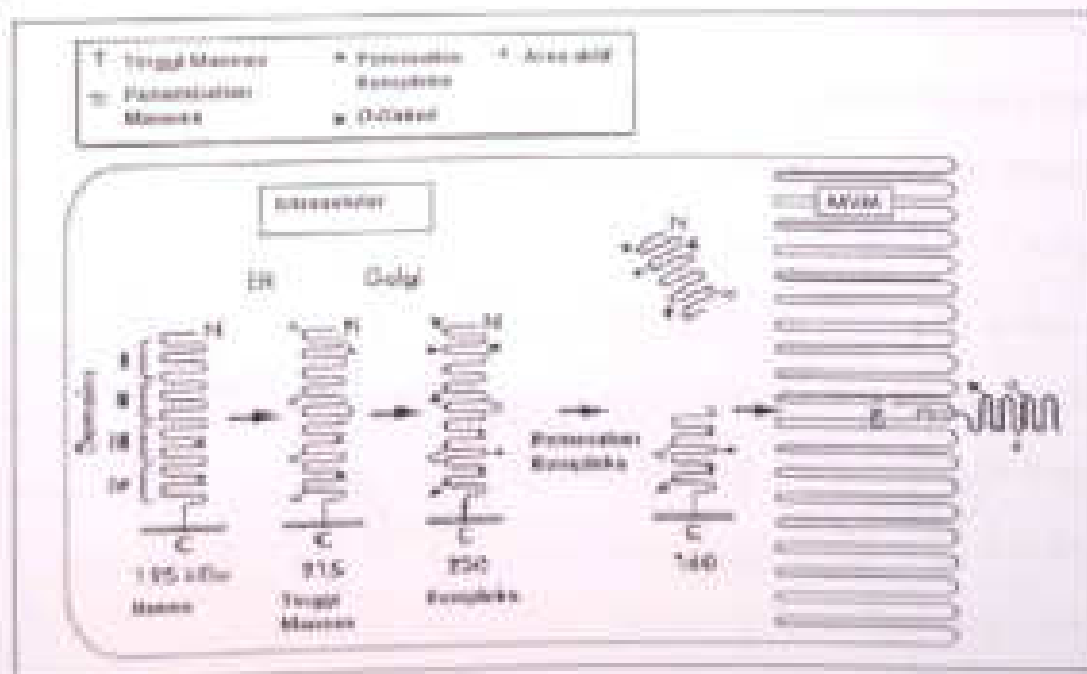
aktivitas serupa dengan LPH pada brush border, dan pro-LPH tak perlu mengalami pemecahan proteolitik menjadi LPH untuk dapat dibawa ke membran enterosit. Diduga bahwa pemecahan pro-LPH hanya mengubah bentuk konformasinya saja (gambar 2.7). Perubahannya menjadi LPH tetap diperlukan untuk pengganti bentuk yang ada di brush border.^{30,31}



Gambar 2.7. Laktase - LPH. ^{30,31} Berasal dari *Immunology* 51

LPH mempunyai susunan sub unit yang berbeda, adalah suatu enzim yang terdiri dari rantai polipeptida tunggal dengan 2 domain yang mempunyai aktivitas enzim. Enzim ini disintesis sebagai suatu molekul prekursor dengan berat molekul

205-245 kDa, lalu akan mengalami perubahan selanjutnya menjadi bentuk yang matang dengan berat molekul yang lebih ringan, 160 kDa. Molekul laktase matang terdiri dari 1927 asam amino. Pro-laktase/pro-LPH disintesis dan mengalami glikosilasi di retikulum endoplasma. Dalam aparatus Golgi molekul ini akan diubah menjadi molekul terlikosilasi yang kompleks dan akan dipecah oleh suatu protease yang menyerupai tripsin. Bentuk matangnya akan di bawa ke membran brush border enterosit. Sebagian pro-LPH tidak mengalami pemecahan dan akan dibawa juga ke membran enterosit. Di sini pro-LPH akan dipecah oleh protease intraluminal. Laktase akan terikat pada membran brush border dengan suatu segmen hidrofobik pendek pada rantai terminal C. Enzim ini mempunyai 3 fungsi, sebagai β galaktosidase dan sebagai glukosidase. Laktase akan memecah molekul laktosa dan selobiosa^(29,30). Laktase merupakan enzim yang pertama mengalami perubahan karena enzim ini terletak paling superficial, dan akan sangat dipengaruhi oleh perubahan pada vilus usus.^{24,28}

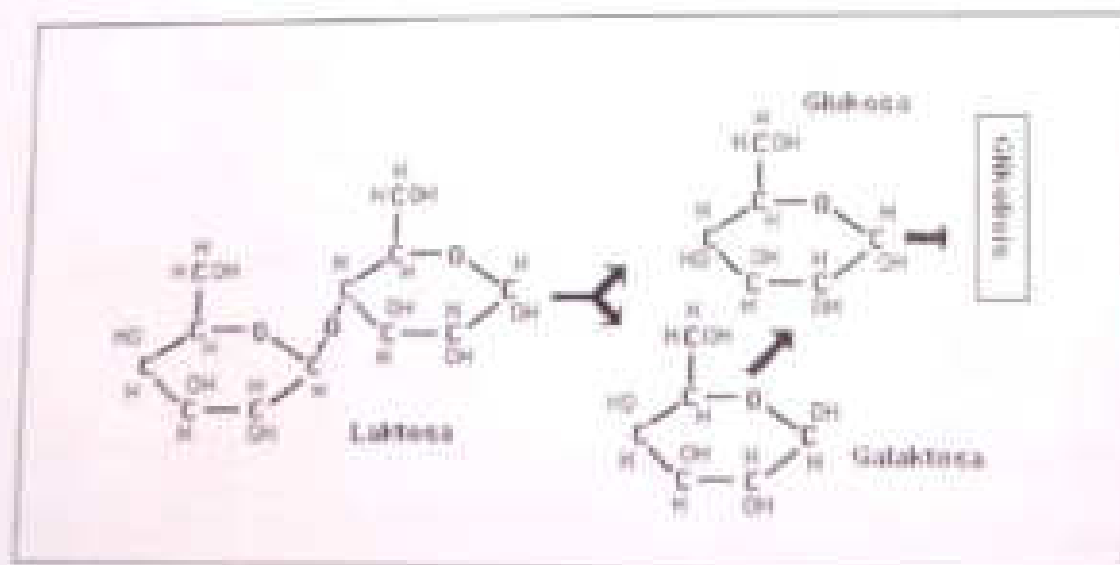


Gambar 1.8. Sistem laktase di enterosit. diadaptasi dari Kapardian 97

Laktase merupakan suatu polipeptida tunggal, disintesis dalam bentuk prekursor (pro-LPH) dengan berat molekul 205-245 kDa, mengalami glikosilasi di retikulum endoplasmik, dan dalam badan Golgi menjadi bentuk kompleks terglikosilasi dan akan dipecah oleh protease yang menyerupai tripsin, kemudian akan menjadi bentuk molekul matang dengan berat molekul 120-130 kDa.²⁷

Terdapat perbedaan berat molekul dengan hewan, kemungkinan akibat perbedaan pada fase glikosilasinya. Molekul laktase pada manusia terdiri dari 1827 asam amino. Laktase ini (LPH) dan prolaktase akan ditransportasi ke *brush border* membran enterosit dan akan dipecah oleh protease lumen usus. Molekul LPH ini terikat ke *brush border* melalui segmen hidrofilik C-terminal (gambar 2.8). Laktase hanya dijumpai pada mamalia, tetapi makhluk hidup lain mempunyai bentuk molekul yang menyerupainya.^{21,24,28}

Enzim laktase berfungsi untuk memecah laktosa, gula utama yang terkandung dalam susu, jumlahnya berkisar antara 2-8%.²⁹ Laktosa terdiri dari gabungan 2 sub unit, galaktosa dan glukosa dengan rumus molekul $C_{12}H_{22}O_{11}$ dengan berat molekul 342, yang dihubungkan dengan ikatan β -glikosida (gambar 2.9).³⁰



Gambar 2.9. Molekul laktosa. ³⁰Wahyuni dan Sugeng, 2012

Sebelum dapat diabsorpsi, ikatan tersebut harus dihidrolisis oleh enzim laktase-phlorizin hidrolase (LPH, laktase, suatu β -galaktosidase). Laktase mempunyai 2 gugus, yaitu yang mempunyai aktivitas laktase (β -galaktosidase) dan aktivitas glukosidase. Laktase akan memecah laktosa dan selobiosa (pada beberapa hewan juga menghidrolisis fukosida dan glukosida), sedangkan glukosidase menghidrolisis phlorizin, gliserolamida dan alkil glikosida lain.^{18,40,48,50} Glukosa dan galaktosa yang terbentuk akan diabsorpsi melalui proses yang tergantung sodium dan energi.^{21,52}

Transpor glukosa akan dilakukan melalui *sodium dependent hexose transporter (SGLUT)*. Ekspresi protein tersebut tidak mengalami perubahan berarti pascanatal pada mamalia. Transpor fruktosa rendah selama menyusui dan akan meningkat saat disapih.⁴⁸

Regulasi laktase ditentukan oleh 2 alel pada gen lokus tunggal yang terletak pada kromosom 2q. Pada manusia, adanya polimorfisme genetik menentukan apakah laktase akan mengalami *down regulation* pada saat seseorang menjadi dewasa. Pada manusia terdapat 2 fenotipe untuk laktase, yang tetap persisten tinggi dan tipe *adult onset deficiency* atau *non persistent*. Bentuk laktase yang persisten lebih dominan dari non persisten. Berdasarkan pengukuran laktase daerah jejunam, maka subjek tipe non persisten mempunyai aktivitas laktase < 7 unit/g protein, sedangkan pada subjek tipe persisten aktivitasnya > 35 unit/g protein. Bentuk heterozigot mempunyai kadar normal di antaranya, aktivitas ini cukup untuk menghidrolisis 50 g laktosa pada percobaan *lactose tolerance test*.²¹ Pada tipe persisten, aktivitas laktase tetap tinggi sepanjang masa hidupnya, kelompok ini terutama terdiri dari golongan kaukasian terutama di daerah Eropa Utara dan Barat. Tipe non persisten mengalami penurunan aktivitas laktase, ditandai dengan

penurunan aktivitasnya pada usia 5-7 tahun hingga 10%, kemudian semakin rendah atau menghilang. Gelongan ini terutama dijumpai di Asia dan Afrika.^{11,12}

Lee dkk. pada penelitiannya menemukan bahwa meskipun aktivitas disakaridase usus berkurang dengan bertambahnya usia, tetapi tidak dijumpai adanya penurunan mRNA LPH dan SI. Penurunan enzim LPH dan SI diduga disebabkan oleh berkurangnya efisiensi translasi mRNA, peningkatan degradasi protein dan/atau inaktivasi parsial situs disakaridase yang aktif. Pada tikus total protein mukosa di jejunum dan ileum tidak berubah dengan bertambahnya usia, tetapi aktivitas sukrase dan protein SI mengalami penurunan.¹³

Beberapa jenis obat dapat juga memengaruhi aktivitas laktase, misalnya antibiotika seperti neomisin, streptomisin oral, kloramfenikol. Aktinomisin akan mempengaruhi transkripsi gen laktase. Antagonis H₂ juga mempunyai efek inhibisi pada laktase. Derivat inhibitor glikosidase seperti acarbose akan menghambat sukrase tanpa mempengaruhi laktase.¹⁴

2.2.4.2. Sukrase-isomaltase (SI)

SI terdiri dari heterodimer 2 sub unit yang serupa tetapi tidak identik. Tiap sub unit terdiri dari rantai polipeptida terglikosilasi dengan berat molekul antara 120-160 kDa. SI terikat pada brush border membran mikrovilus enterosit pada sub unit isomaltasenya, sebagian berat molekulnya keluar dari membran dan berada di lumen. SI disintesis sebagai prekursor tunggal mulai dari N terminal isomaltase. Terdapat homologi antara isomaltase dan sukrase (41% asam amino). Keduanya berasal dari duplikasi gen yang mengalami perubahan, terletak di kromosom 3. Bentuk prekursor mempunyai berat molekul besar di fraksi mikrosomal aparatus

Golgi lalu dibawa ke brush border enterosit. Di sini akan dipecah menjadi sub unit sukrose dan isomaltase oleh enzim protease pankreas.^{49,50}

Enzim ini bersifar *Acid labile*, kedua sub unitnya memecah maltosa, maltotriosa, maltitol, α -D-glukopiranosida, dan sel α -glukopiranosida (jarang). Sub unit sukrose memecah sukrosa dan turanosa. Sub unit isomaltase memecah ikatan 1,6- α -glukopiranosil pada isomaltosa, isomaltulosa, manosa dan rantai cabang α dekstrin. Enzim ini memecah karbohidrat dari tanaman yaitu sukrosa dan pati yang ada pada diet manusia setelah diupih. Dalam diet dunia barat, pati merupakan 50% dari karbohidrat yang diserap selain sukrosa. Dalam pati terdapat amilosa dan amilopektin. Amilosa merupakan bentuk linier dan terdiri dari ikatan 1,4- α -glukosidik (rantai lurus) dan 1,6- α -glukosidik (rantai cabang). Dalam saluran cerna, pati dihidrolisis menjadi glukosa oleh amilase saliva dan pankreas yang terdapat di lumen dan oleh α -glukosidase pada mukosa usus, dan kemudian diabsorpsi melalui brush border. Hasil pemecahan adalah maltosa dan maltotriosa. Hasil akhir pemecahan amilopektin adalah sedikit glukosa, maltosa dan maltotriosa serta dekstrin cabang.⁴⁹

Pada manusia setelah tahun pertama kehidupan, α amilase di getah duodenum tinggi setelah makan. Amilopektin yang digunakan dalam tes pembebanan mengandung 5000 unit glukosa yang akan diserap di distal duodenum, diubah menjadi oligosakarida yang terdiri dari 3 glukosa (maltosa, maltotriosa dan dekstrin), kemudian 80% nya oleh SI dan 20% oleh MI diubah menjadi glukosa. Setelah pembebanan 100 g tepung, 5-20% di antaranya tak dapat diabsorpsi usus halus. Pada mamalia pada saat lahir hanya ada β -glukosidase dan glukosaminase. SI timbul saat lahir terutama setelah penyapihan. Pada saat bersamaan laktase akan

namun hingga mencapai kadar 10% dibanding saat lahir. Bayi kurang dari 6 bulan katabolisme tak dapat mencerna amilopektin sempurna bayi yang lebih tua biasanya, tetapi masih dapat mengabsorpsi sejumlah pati dan polimer glukosa oleh karena adanya *alternative pathway* melalui amilase saliva. Sisanya akan dicerna bakteri di kolon. Aktivitas α -amilase usus (pankreas) baru akan mencapai kadar seperti dewasa beberapa saat setelah kelahiran.⁴⁸

2.2.4.3. Maltase-glukoamilase (MG)

Letak dan bentuk molekulnya mirip dengan SI. Molekul ini juga disintesis dari 1 rantai polipeptida dengan berat molekul besar lalu dipecah menjadi 2 sub unit oleh protease pankreas. Kompleks β -glukosidase bentuk perkusurnya selalu mengalami pemerataan pasca translasi oleh enterosit peptidase.^{49,50}

Maltose merupakan bentuk disakarida yang terdiri dari 2 molekul glukosa yang saling berhubungan pada gugus karbox 1 dan 4, dengan rumus molekul $C_{12}H_{22}O_{11}$, mempunyai rasio hidrogen dan karbon 2:1. Bentuk molekul yang lebih banyak akan membentuk dekstrin. Gen pengatur terletak pada kromosom 3q25-q26.^{49,51}

2.2.4.4. Trehalase

Enzim ini memecah α,α , trehalosa, 6,6-dideoksi- α,α , trehalosa, α dan β -glukopiranosida. Trehalosa adalah suatu disakarida yang terdapat pada serangga dan jamur.^{49,52}

Pada orang dewasa karbohidrat utamanya adalah tepung dan sukrosa. Perubahan bentuk tepung menjadi glukosa dilakukan oleh maltase glucoamilase dari mukosa usus yang diatur oleh gen MGAM pada kromosom 7. Sedangkan

perubahan pada tahap akhirnya dilakukan dengan mukosa *sucrase-isomaltase* (SI) yang diatur oleh gen SI pada kromosom 3q26. Kedua enzim tersebut bekerja secara komplementer dalam mencerna tepung.¹⁶ Sukrosa akan dipecah menjadi glukosa dan fruktosa. Fruktosa akan masuk secara berdifusi ke dalam sel mukosa usus.¹⁸

2.3. METABOLISME BESI

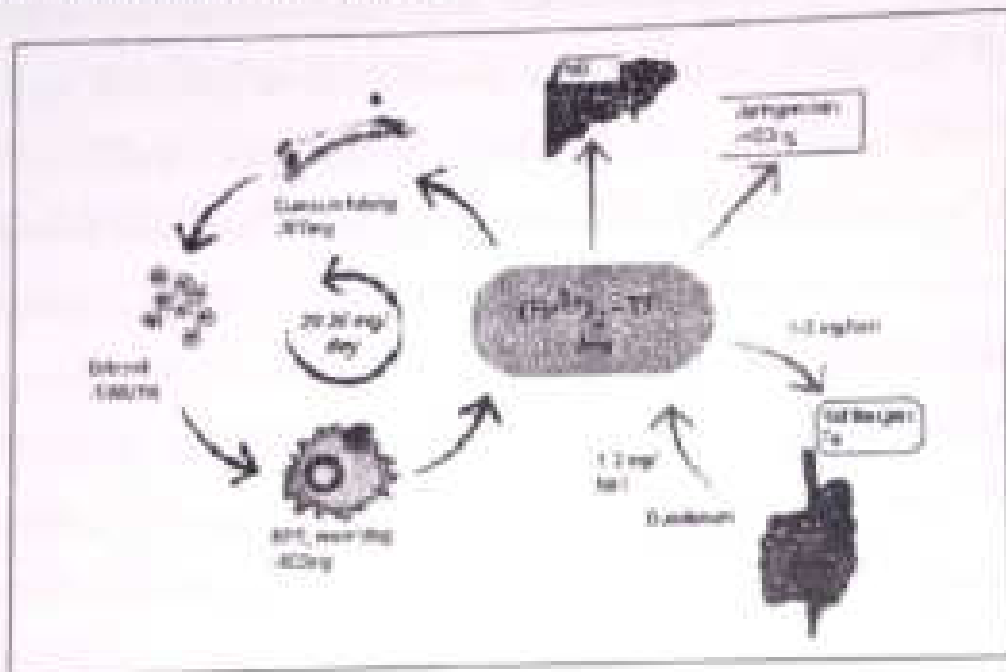
2.3.1. Jumlah besi tubuh

Besi merupakan salah satu mineral yang banyak dibutuhkan oleh berbagai organ dalam tubuh. Jumlah besi tubuh pada orang dewasa pria adalah sekitar 50 mg/kgBB, sedangkan pada wanita sekitar 35 mg/kgBB. Bayi usia cukup bulan yang baru lahir akan mempunyai besi sejumlah 75 mg/kg BB, besi tersebut terutama diperoleh dari ibunya pada saat trimester ke-3 kehamilan. Cadangan besi tersebut akan segera habis terpakai di beberapa bulan awal kehidupannya, dan diperlukan asupan besi yang cukup untuk memenuhi kebutuhan selama masa pertumbuhan.¹⁷

Sebagian besar besi tubuh berada dalam bentuk heme, terutama hemoglobin dan mioglobin. Sebagian kecil ada dalam enzim yang digunakan dalam transfer besi (peroksidase, katalase dan ribonukleotida reduktase) atau enzim yang mengoksidasi gugus sulfid-besi. Sisa bentuk non heme (sekitar 1 mg pada pria dewasa) terutama berada dalam bentuk besi cadangan ferritin dan hemosiderin dalam makrofag atau hepatosit. Hanya sebagian kecil (0,1%) berada dalam bentuk terikat dengan transferrin, suatu protein pembawa besi di plasma.¹⁹

Asupan besi tubuh terutama berasal dari makanan dan diabsorpsi di usus kecil. Secara normal besi keluar dari tubuh melalui sel yang lepas melalui saluran cerna, saluran kemih, kulit dan pada wanita melalui darah menstruasi. Keluarnya

besi melalui saluran kencing dan keringat sangat sedikit, yaitu $< 0,05$ mg/hari dan $22,5$ $\mu\text{g/L}$. Total kehilangan besi tubuh hanya sekitar $1,0$ mg/hari pada pria dan wanita (yang tidak haid). Pada wanita, kehilangan melalui menstruasi adalah sekitar $0,025$ mg/kgBB/hari, sedangkan pada wanita hamil kehilangan besi adalah sekitar tiga setengah kali lipat pria. Umumnya kehilangan besi yang kecil itu dapat diganti dengan besi yang berasal dari asupan makanan. Mekanisme kontrol untuk besi tubuh terletak pada absorpsinya di usus, bukan dari ekskresinya.¹⁶



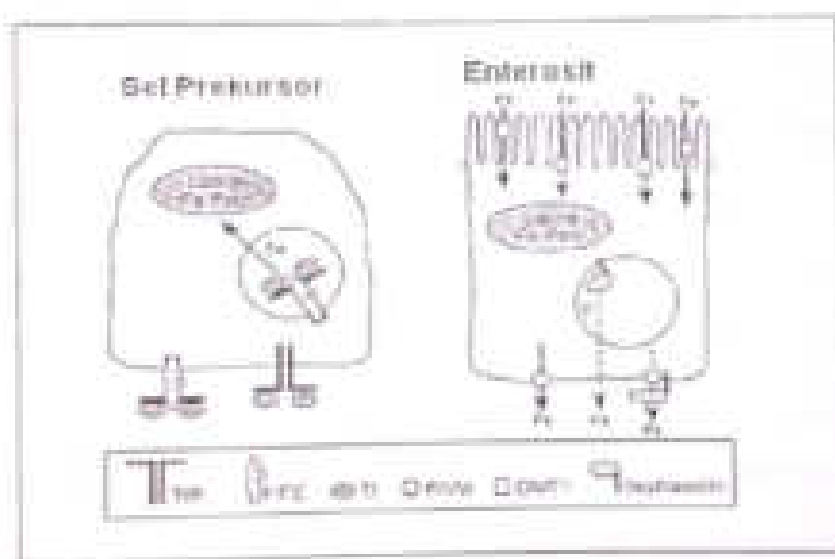
Gambar 2.10. Siklus daur ulang besi dalam tubuh. Ilustrasi dari *Keperawatan 01*

Sebagian besar besi yang digunakan tubuh berasal dari siklus daur ulang besi yang memang telah ada dalam tubuh. Proses yang melibatkan penggunaan terbesar besi adalah pada siklus pembentukan dan degradasi eritrosit. Setelah usia eritrosit mencapai sekitar 120 hari, maka akan difagositosis oleh makrofag, yaitu sel retikuloendotelial yang terutama berada di limpa. Eritrosit akan mengalami pemecahan untuk akhirnya melepaskan besinya dari heme. Sebagian besar besi tersebut akan masuk ke plasma, terikat dengan transferin dan dapat digunakan

ulang pada eritropoiesis, sebagian kecil akan tersimpan sebagai cadangan dalam bentuk ferritin dan hemosiderin. Pada pria dewasa jumlah besi yang masuk dalam siklus tersebut mencapai 30 mg Fe, sekitar 2 mg akan keluar dari plasma dan masuk ke sel parenkim hati serta jaringan lain untuk disimpan atau digunakan untuk sintesis protein non heme seperti mioglobin dan sitokrom (gambar 2.10).^{21,22}

2.3.2. Proses absorpsi besi di enterosit

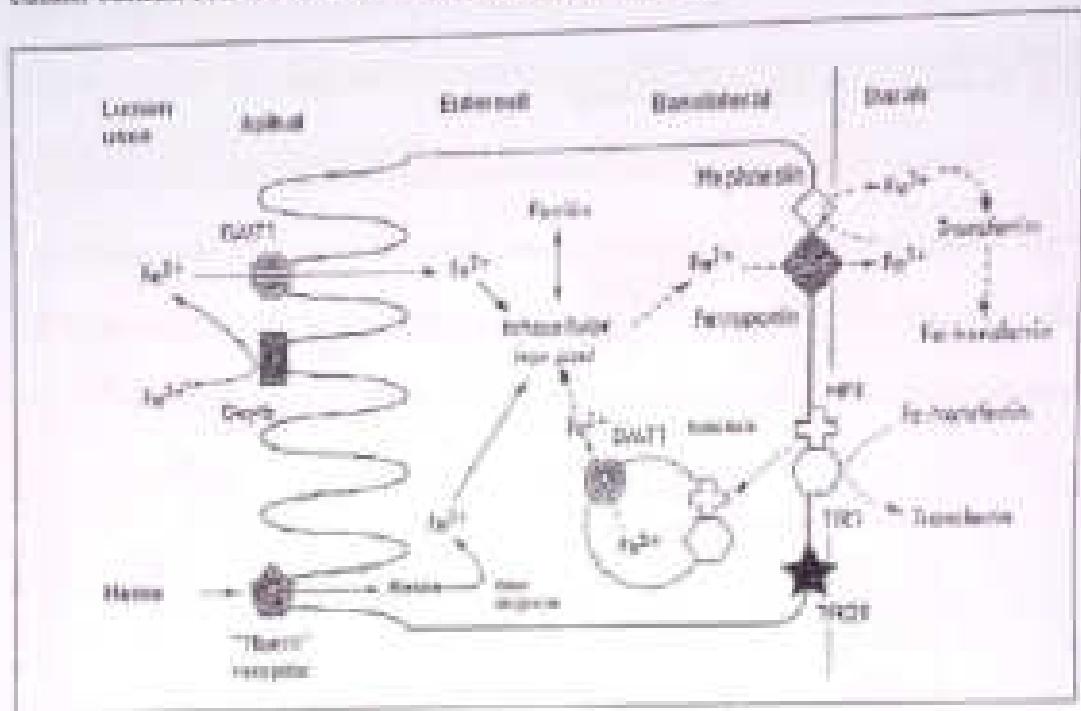
Sel stem di dasar kriptus daerah duodenum akan mendapat besi dari transferrin sesuai dengan jumlah besi tubuh yang tersedia dalam sirkulasi. Besi akan masuk ke dalam sel stem melalui transferrin receptor (TfR) dengan difasilitasi oleh protein HFE (hepatocromatosis) yang berada didekatnya pada membran basolatera enterosit.²³



Gambar 2.11. Proses penempatan setting point untuk absorpsi besi di enterosit duodenum.²⁴

Jumlah besi yang dapat masuk akan menyebabkan sel enterosit terprogram untuk dapat mengabsorpsi sejumlah tertentu besi dari nutrisi di lumen sesuai dengan kebutuhan besi tubuh saat itu (gambar 2.11). Regulator yang mengatur adalah regulator eritropoiesis dan regulator cadangan tubuh.²⁵

Absorpsi besi di enterosit memerlukan protein transporter DMT1 yang berada di membran apikal, besi yang masuk harus direduksi dahulu oleh sitokrom b duodenum (*duodenal cytochrome b*, Dcytb). Besi yang masuk akan berada dalam *intra cellular labile iron pool*, dapat diikat oleh apoferritin dan disimpan dalam bentuk feritin bila belum dibutuhkan oleh tubuh.^{16, 20}



Gambar 2.13. Proses absorpsi dan masuknya besi ke sirkulasi. Dibuat dari literatur 16

Besi yang diperlukan tubuh akan keluar melalui transporter ferroportin di membran basolateral, dan kemudian dioksidasi kembali oleh hephaestin menjadi bentuk feri untuk selanjutnya dibawa oleh transferrin ke sumsum tulang untuk memenuhi kebutuhan eritropoiesis. Terdapat 2 hal yang dapat meregulasi absorpsi besi dari duodenum, regulator pertama adalah aktivitas eritropoiesis sedangkan regulator lain adalah besarnya cadangan besi tubuh yang dicerminkan dari kadar saturasi transferrin dan feritin plasma. Regulator eritropoiesis tampaknya mempunyai efek yang lebih dominan terhadap pengaturan absorpsi besi dibandingkan dengan regulator cadangan tubuh.^{16, 20}

Besi juga dapat diabsorpsi melalui reseptor heme yang sangat efisien, tetapi mekanismenya secara molekular belum diketahui dengan jelas.¹⁶ *Divalent Metal Transporter 1* (DMT1, juga dikenal sebagai Nramp2 dan DCT1) adalah suatu transporter transmembran yang berfungsi untuk transpor besi non heme melalui membran apikal enterosit. Ekspresi DMT1 duodenal akan mengalami peningkatan pada keadaan kekurangan besi dan hemokromatosis. DMT1 juga merupakan transporter bagi beberapa ion logam divalen lain seperti Mn dan Zn. DMT1 juga dianggap berfungsi pada transport besi melalui membran endosomal (gambar 2.12). Molekul ini dianggap berperan dalam pengaturan masuk keluarnya besi dari sel.^{16,20}

Feder dkk, melaporkan adanya suatu gen yang mengatur ekspresi protein HFE, suatu protein *major histocompatibility complex class I*, yang dalam sel parankim, akan berinteraksi dengan reseptor transferin (TfR) untuk menginibisi ambilan besi yang terikat transferin. Transpor besi melalui membran basolateral enterosit juga diregulasi oleh HFE, melalui mekanisme yang belum diketahui secara jelas. Diduga bahwa HFE menyebabkan sel kriptas di usus berfungsi sebagai sensor untuk mengetahui keadaan cadangan besi tubuh dan mempersiapkan enterosit yang bermigrasi untuk mengabsorpsi besi sesuai kebutuhan tubuh.^{18,21}

2.3.3. Proses homeostatis besi

Sebagian besar besi fungsional tubuh berasal dari siklus daur ulang besi yang sudah berada dalam tubuh. Sumber terbesar berasal dari pemecahan eritrosit di RES. Besi hasil pemecahan tersebut akan kembali ke plasma, diangkut oleh transferin untuk dibawa kembali ke sumsum tulang untuk eritropoiesis. Sebagian akan tersimpan dalam bentuk cadangan besi ferritin dan transferin. Pada orang

dewasa normal, sekitar 70 mg besi akan mengalami resirkulasi ini, dari jumlah tersebut hanya 2 mg saja yang akan masuk ke parenkim hati dan beberapa jaringan lain untuk pembentakan heme protein lain seperti mioglobin dan sitokrom.^{16,17}

Dianggap bahwa terdapat suatu sistem dalam tubuh yang dapat mengatur dan saling berkomunikasi organ-organ yang berhubungan dengan metabolisme besi. Diperkirakan terdapat suatu regulator yang dapat mengatur agar tubuh tidak kekurangan atau kelebihan besi. Terdapat suatu mekanisme tubuh untuk pengaturan besi yang akan masuk melalui enterosit duodenum serta pelepasan besi cadangan dari sel RES guna memenuhi kebutuhan besi tubuh. Mekanisme pengaturan tersebut dilakukan oleh suatu hormon peptida kecil yaitu hepsidin. Pada keadaan kelebihan muatan besi maka hepsidin, suatu hormon peptida yang membatasi transfer besi dari lumen ke dalam tubuh, akan menyebabkan besi tersebut tidak dapat keluar dari enterosit untuk mencegah terjadinya kelebihan besi yang lebih besar. Pada saat tubuh sangat memerlukan besi untuk eritropoiesis maka sintesis hepsidin di hati akan mengalami penurunan (*down regulation*), sehingga besi yang diperlukan bisa dibawa keluar dari enterosit untuk masuk ke dalam sirkulasi sistemik.^{17,18}

Diketahui bahwa keadaan kekurangan besi akan juga berpengaruh pada saluran gastro intestinal, antara lain dengan menurunnya asam lambung, gangguan absorpsi dan perubahan permeabilitas usus. Menurut beberapa peneliti seperti yang dikutip oleh Fernandez, pada manusia serta beberapa binatang percobaan seperti anjing dan tikus yang menderita anemia defisiensi besi akan dijumpai penurunan disakarida jejunal. Penyebab keadaan tersebut belum diketahui dengan jelas. Umumnya secara histologi gambaran mukosa usus tampak normal, tetapi dapat dijumpai adanya penurunan indeks mitotik.¹⁹

Fernandes, pada percobaannya pada mencit yang diupih, menjumpai adanya penurunan berat badan dan laktase pada kelompok mencit yang mendapat makanan dengan kadar besi kurang selama 6 minggu, sedangkan sukrase dan maltase tidak mengalami perubahan. Perubahan tersebut akan reversibel dengan pemberian kembali besi yang adekuat setelah 4 minggu, kecuali pada berat badan. Dijumpai adanya penurunan aktivitas total dan spesifik laktase pada mencit dengan kekurangan besi meskipun hal tersebut tak berpengaruh pada jumlah populasi sel serta proliferasi sel mukosa usus. Laktase merupakan enzim yang pertama mengalami perubahan karena enzim ini terletak paling superfisial, dan akan sangat dipengaruhi oleh perubahan pada vilus usus. Pada penelitian lain di mana pajanan kekurangan besi dijumpai dalam jangka waktu yang lebih lama, juga akan terjadi penurunan pada sukrase serta maltase. Penurunan tersebut diduga akibat adanya perubahan fungsional enterosit.²¹ Pada penelitian tersebut, usus kecil diambil untuk pengukuran enzim disakaridase sesuai cara Dahlqvist, jejunum untuk pengukuran populasi dan proliferasi sel. Hasil pengukuran disakaridase dinyatakan dalam unit(U). Satu unit adalah kemampuan untuk menghidrolisis 1 μmol disakarida per menit pada suhu 37°C. Aktivitas yang diukur pada seluruh usus kecil dianggap sebagai aktivitas total, sedangkan aktivitas per gram usus basah dianggap sebagai aktivitas spesifiknya. Untuk uji proliferasi sel, sel dihentikan pembelahannya pada stadium metafase dengan vinkristin. Tikus tanpa vinkristin dianggap sebagai kontrol basal indeks mitotik. Potongan usus sepanjang 1 cm usus diambil dari proksimal jejunum, dihitung jumlah sel di vilus dan kriptinya, dan jumlah mitosisnya. Dekalkulasi indeks mitotik dan kecepatan pembentukan sel.^{21,22}

2.1.4. Transferin

Transferin adalah protein pengangkut besi dalam plasma. Merupakan suatu glikoprotein dengan berat molekul 80 kD. Pengaturannya dilakukan oleh gen yang terletak pada kromosom 3q21 dekat gen untuk seruloplasmin dan laktoferin. Transferin terutama disintesis di parenkim hati, sebagian kecil juga diproduksi oleh susunan syaraf pusat, ovarium, testis dan sel T helper. Terdapat hubungan terbalik antara transferin dengan cadangan besi tubuh. Bila cadangan besi tubuh kurang maka produksi transferin akan meningkat.¹⁸

Transferin dibentuk dalam bentuk preprotein. Pada proses pematangannya 19 asam amino awalnya akan lepas dan diganti dengan gugus karbohidrat untuk menjadi bentuk matang dan disekresikan ke plasma. Waktu paruhnya adalah 10 hari. Katabolismenya belum jelas diketahui. Dalam keadaan normal kadarnya 2-3 mg/L. Transferin ini diukur dalam kemampuannya mengikat besi, yaitu sebagai total *iron binding capacity* (TIBC), yang kadar normalnya adalah 300ug/dL. Besi dalam plasma dalam keadaan normal adalah sekitar 100 ug/dL. Hanya sekitar sepertiga transferin yang terikat besi, sisanya dapat berfungsi untuk mengikat kelebihan besi. Pengukuran kadar besi tubuh mempunyai variasi diurnal, konsentrasi tertinggi adalah pada pagi hari dan terendah sore hari.²⁰

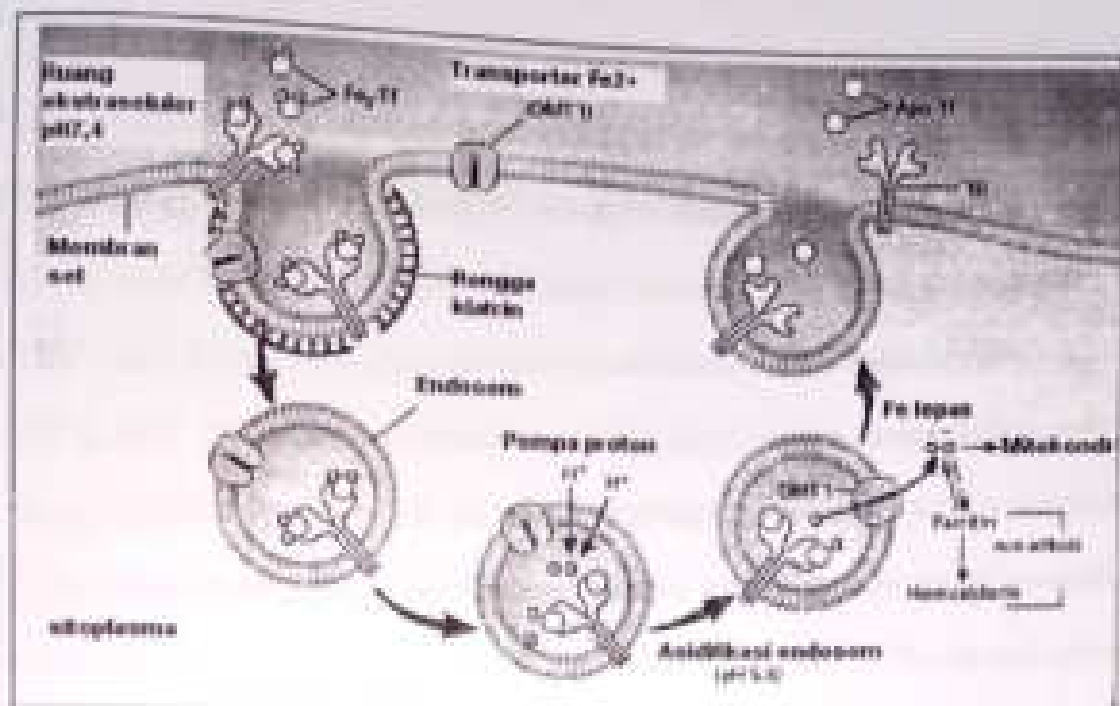
Molekul transferin mempunyai 2 domain homologus untuk mengikat besi, masing-masing akan mengikat 1 atom besi. Pengikatan besi terjadi satu persatu secara random. Transferin akan dapat berbentuk mono atau diferi-transferin. Besi yang terikat akan terletak dalam kantong yang terbentuk oleh 2 lingkaran polipeptida. Ligan metalnya adalah residu tirosin, histidin dan aspartat. Pada setiap pengikatan atom besi akan terlepas 3 ion hidrogen dan satu molekul anion, biasanya karbonat

atau bikarbonat. Transferrin mempunyai warna merah muda dengan puncak absorpsi 465 nm, merupakan hasil interaksi antara besi, bikarbonat dan *binding site*. Dalam keadaan normal transferrin mempunyai afinitas sangat tinggi untuk besi, ikatan ini berkurang bila pHnya turun. Transferrin dapat mengikat molekul metal lain seperti kuprum, mangan, aluminium, kobalt, tetapi dengan afinitas yang lebih rendah dibanding besi. Janin tikus yang mengalami mutasi sehingga tak mempunyai reseptor transferrin akan mati karena inefektifnya pengangkutan besi ke jaringan.^{41,42}

Transferrin akan membawa besi ke normoblas dan sel lain, kemudian terikat dengan reseptor spesifik transferrin (*Transferrin receptors*, TFR) di permukaan sel. TFR ini merupakan suatu glikoprotein dengan gugus sulfida dengan *single membrane spanning segment* dan *short cytoplasmic segment*. Merupakan tipe II protein membran, dengan N terminalnya di dalam sel. Berat molekul TFR adalah 180 kD, gen yang mengaturnya terletak pada kromosom 3q29. Tiap TFR homodimer dapat mengikat 2 molekul transferrin. Transferrin dalam bentuk dimerik mempunyai afinitas lebih tinggi untuk reseptornya sehingga mempunyai kemungkinan lebih besar untuk melepaskan bebannya ke prekursor eritrosit. Apotransferrin hanya mempunyai afinitas kecil terhadap reseptor pada pH fisiologis, tetapi mempunyai afinitas tinggi pada pH rendah. Terdapat molekul TFR2 yang mempunyai 45% homologi terhadap TFR di bagian domain ekstraselularnya. TFR2 mengikat transferrin dengan afinitas yang lebih rendah dan fungsinya belum diketahui jelas. Penderita dengan mutasi gen TFR2 akan mengalami keadaan kelebihan besi yang menyerupai hemokromatosis herediter klasik.²⁸

Jumlah TRPC akan meningkat pada saat maturasi eritrosit, mencapai puncaknya pada *intermediate normoblast*. Jumlahnya sangat sedikit pada BFU (burst forming unit) dan CFU (*colony forming unit*). Pada saat awal stadium normoblas, dapat dijumpai sekitar 300.000 reseptor pada tiap sel, kemudian meningkat hingga 800.000 saat stadium *intermediate normoblast*. Kemampuan mengambil besi sangat tergantung pada jumlah reseptornya. Jumlah reseptor akan berkurang saat memasuki stadium retikulosit, dan pada saat eritrosit matang maka semua reseptor yang sisa akan dilepas dengan cara ekselosis dan pemecahan proteolitik, dan bentuk ini akan dapat dijumpai di plasma sebagai TFRC yang bersirkulasi. Plasma TFRC merupakan indikator yang sensitif untuk mendeteksi jumlah masa eritrosit dan kekurangan besi.^{14,15}

Pada saat ligan dan reseptor berinteraksi, transferrin melalui ikatan reseptornya akan mengalami endositosis. Proses dimulai dengan invaginasi daerah yang dilapisi klatrin. Akan terbentuk vesikel endositik yang akan mengalami acidifikasi hingga pHnya 5-6 akibat influx proton, sehingga akan terjadi pelepasan besi dari transferrin dan sekaligus mempererat ikatan apotransferrin dengan reseptornya. Besi yang dilepas akan mengalami reduksi oleh suatu ferri reduktase dan ditransfer ke sitosol melalui DMT1 (gambar 1.13).¹⁶



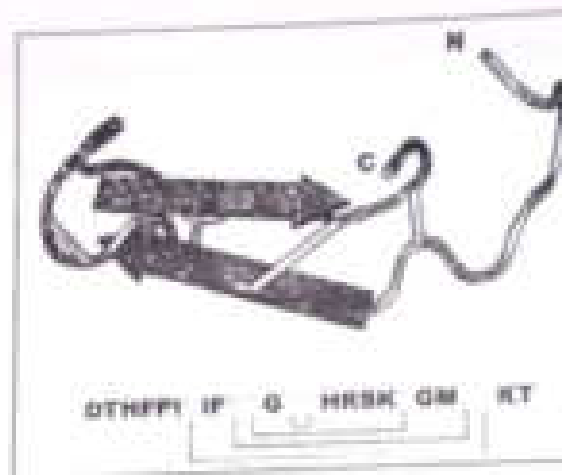
Gambar 2.13. Proses masuknya besi melalui reseptor transferin. Diadaptasi dari Lippman dan Lippman 19

2.3.5. Hepsidin

Hepsidin adalah suatu hormon peptida yang berperan dalam menjaga homeostasis besi dalam tubuh.^{47,44,48} Secara bersamaan hepsidin ditemukan oleh 2 kelompok peneliti yang berbeda, yaitu Park dkk. dan Krause dkk. sebagai suatu *cysteine rich peptide* yang ada dalam plasma dan urin manusia, dan mempunyai sifat sebagai antimikroba. Park dkk. mengisolasi *hepcidin* (hep=hepar, cidin=bakterisidal) dari urin, sedangkan Krause dkk. mengisolasinya dari darah dan diberi nama LEAP-1 (*liver expressed antimicrobial peptide 1*) karena peptida tersebut dibuat di hati.⁴⁹⁻⁵¹

Hepsidin adalah suatu peptida yang diatur oleh gen HAMP yang terdiri dari 3 ekson dan 2 intron. Manusia dan tikus mempunyai 1 buah gen HAMP yang terletak pada lengan panjang kromosom 19 (19q13), sedangkan mencit mempunyai 2 gen yaitu *Hamp1* dan *Hamp2* yang terletak pada kromosom 7. Ekspresi mRNA hepsidin terutama ada di hati, dan dalam jumlah rendah dapat

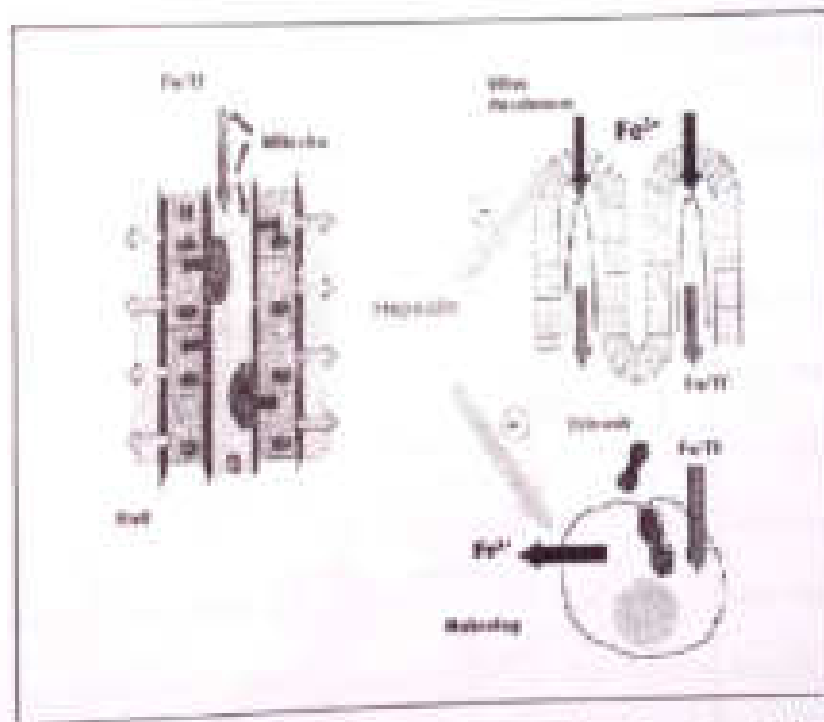
juga dijumpai di usus, lambung, kolon, paru serta jantung.^{63,64} Hasil transkripsinya adalah suatu protein prekursor yang terdiri dari 84 asam amino, termasuk suatu *putative 24 signal amino acid leader peptid*.^{64,65} Bentuk ini akan dipecah menjadi 60 asam amino menjadi prohepsidin yang kemudian akan dipecah lebih lanjut menjadi bentuk matang.⁶⁶ Bentuk matang hepsidin yang aktif hanya terdiri dari gugus karboksilnya, terdiri dari 20-25 asam amino (gambar 2.14). Bentuk ini mempunyai sifat sebagai antiparasit dan antibakteri, dan juga berperan pada reaksi inflamasi. Fungsinya antara lain adalah untuk mengurangi ketersediaan besi bagi mikroorganisme.⁶⁷



Gambar 2.14. Hepsidin. Diadaptasi dari Kaperleban 94

Peran hepsidin pada homeostatis besi pertama kali dikemukakan oleh Pigeon dan Nicolas dkk.^{68,69} Pigeon dkk. melaporkan adanya peningkatan mRNA hepsidin pada pembebanan besi melalui makanan, sedangkan Nicolas dkk. menemukan bahwa terjadi kelebihan besi pada mencit bila gen hepsidinya hilang. Mencit dengan hepsidin tinggi akan menjadi anemia berat, sedangkan mencit dengan gen hepsidin yang tak berfungsi akan mengalami kenaikan besi serum, pengurangan besi di RES serta peningkatan absorpsi besi.⁶⁸

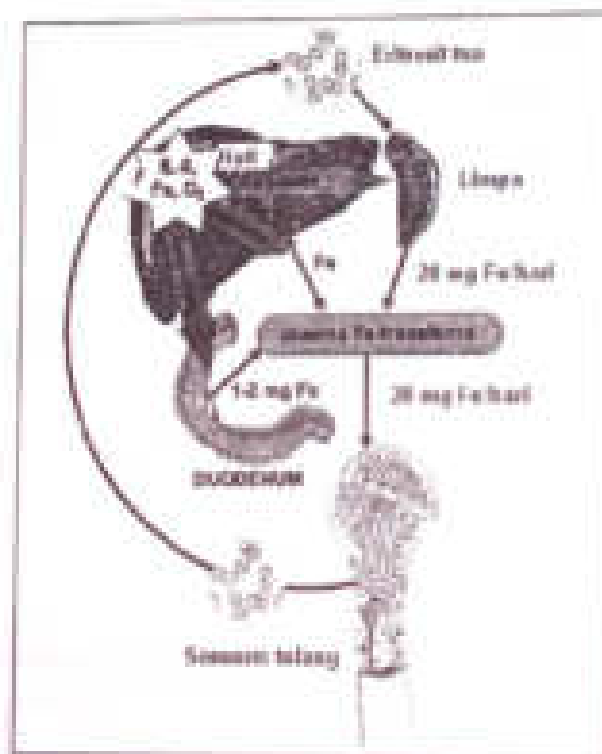
Pada waktu enterosit berdiferensiasi di kriptas Lieberkuhn, sel tersebut akan terprogram untuk dapat mengabsorpsi sejumlah tertentu besi. Besi endogen akan masuk ke dalam enterosit di kriptas dan membantu membuat patukan (*sentry point*) untuk menentukan jumlah besi yang akan diabsorpsi. Akan terdapat lebih banyak besi yang masuk ke enterosit bila cadangan berlebih atau eritropoiesis tertekan, dan jumlah besi yang masuk akan berkurang pada keadaan defisiensi besi atau pada fase akselerasi eritropoiesis. Diperkirakan terdapat suatu sistem pengaturan dalam plasma untuk mengatur absorpsi besi. Diduga pengatur tersebut adalah hepsidin, suatu hormon peptida kecil yang terdiri dari 20-25 asam amino dibuat oleh hati (gambar 2.15).^{18,20}



Gambar 2.15. Fungsi hepsidin di enterosit dan makrofag sebagai modulator eksporter besi ke sirkulasi.
(Sumber dari literatur lain)

Hepsidin dibentuk di hati dalam bentuk prekursor hepsidin yang mempunyai molekul lebih besar, akan keluar dalam plasma sebagai hepsidin, dan ekskresinya terjadi melalui urin. Hepsidin mempunyai bentuk molekul menyerupai suatu

peptida mikrobial yang berperan pada sistem imun. Mencit yang mengalami kehilangan ekspresi hepsidin akan mengalami keadaan kelebihan besi (*iron overload*). Ekspresi hepsidin akan meningkat pada binatang dengan kelebihan besi akibat pemberian besi karbonil. Diduga bahwa peningkatan itu adalah suatu respons kompensasi untuk menghambat absorpsi besi. Hal ini juga dibuktikan oleh laporan bahwa mencit transgenik yang terus menerus mengekspresikan hepsidin akan mengalami anemia defisiensi besi. Ekspresi hepsidin sejarahnya turun pada keadaan anemia defisiensi besi, hipoksia serta inflamasi. Manusia dengan ekspresi hepsidin berlebih juga akan mengalami anemia kekurangan besi. Bukti tersebut menguatkan dugaan bahwa hepsidin adalah suatu regulator solubel yang akan menentukan jumlah absorpsi besi di enterosit.^{18,19}



Gambar 2.16. Pengaturan produksi hepsidin di hati.²⁰ (http://www.kemkes.go.id)

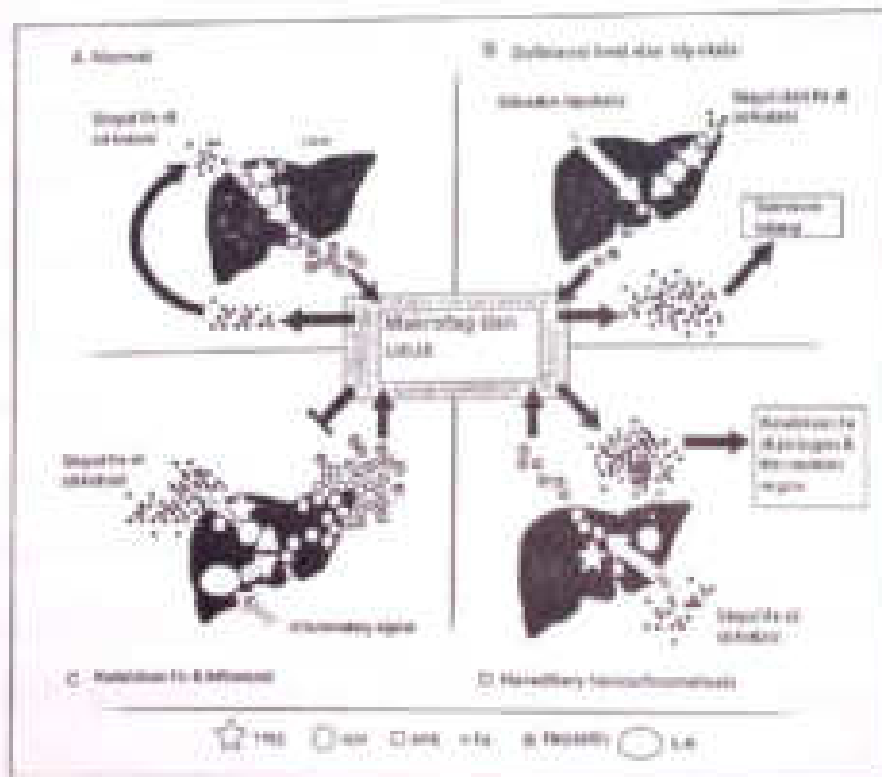
Hepsidin berperan dalam regulasi besi. Hepsidin mengatur masuknya besi dari enterosit, daur ulang besi melalui makrofag dan keluarnya besi dari cadangan

di hati. Sebaliknya ekspresi hepsidin diregulasi oleh cadangan besi tubuh, okogenisasi jaringan dan petanda inflamasi terutama IL-6 (gambar 2.16).⁶⁷ Pada orang normal, jumlah besi plasma akan merangsang sintesis hepsidin oleh hepatosit. Serum hepsidin memodulasi jumlah besi yang akan dilepas makrofag dan enterosit, besi yang dilepas akan masuk ke plasma dan akan mempunyai efek umpan balik pada produksi hepsidin berikutnya. HFE protein HJV dan TFR2 diperlukan untuk menentukan ekspresi hepsidin sebagai respons terhadap banyaknya besi plasma di sirkulasi. HJV dan TFR2 merupakan regulator hepsidin. Pada keadaan anemia defisiensi besi atau keadaan hipokala, transkripsi hepsidin dihentikan, kadarnya dalam darah berkurang, terjadi ekspor besi dari enterosit dan makrofag ke sirkulasi.^{68,69}

Gara telah menemukan cara untuk melakukan pemeriksaan hepsidin di urin, sedangkan Kulakoz menemukan cara untuk mendeteksi adanya hepsidin dalam serum.^{68,69} Kulakoz membuat antibodi terhadap sebagian sekuen prehepsidin dan dapat digunakan untuk mendeteksi hepsidin 25 asam amino di serum maupun hepsidin 20-22 hasil degradasinya di urin. Dengan antibodi tersebut dapat dilihat bahwa sel hepatosit dan HepG2 mengekspresikan hepsidin, terutama di daerah periportal, sedangkan sel Kupfer, iskretal maupun sel duktus biliar tidak mengekspresikannya.⁶⁸

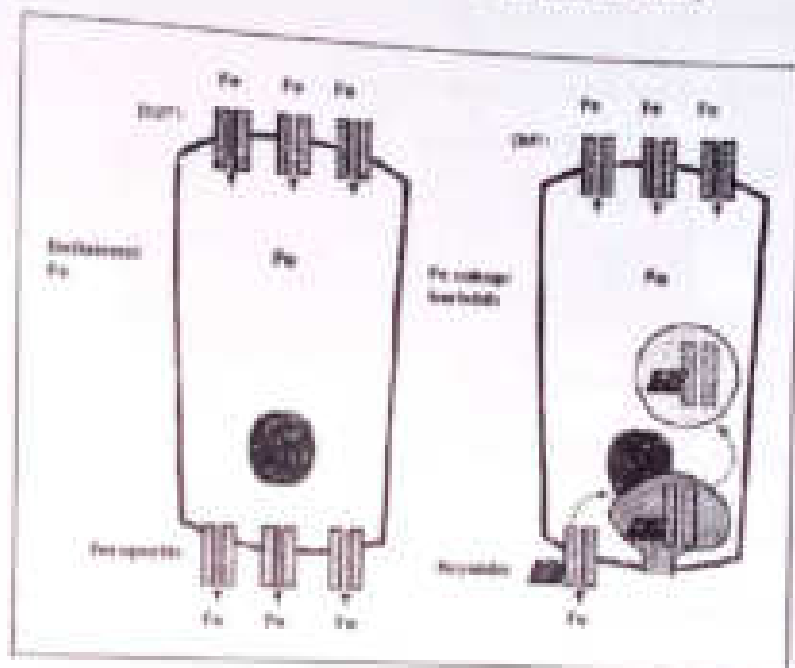
Ekspresi hepsidin akan meningkat pada pemberian lipopolisakarida yang merupakan penginduksi acute phase reactant. Anemia akibat febrile atau hemolitik akan mengurangi ekspresi hepsidin, hal ini diperkirakan karena terjadi respons terhadap adanya hipoksia.⁶⁸ Adanya gangguan pada mutasi gen hepsidin dapat menyebabkan terjadinya *juvenile hemochromatosis*.⁶⁸ Hepsidin dianggap sebagai regulator utama absorpsi besi pada manusia, dengan menghambat efflux besi melalui ferroportin sehingga besi tetap di dalam sel dan didegradasi.^{68,70}

Pada keadaan normal hepsidin akan diproduksi oleh hati sesuai dengan sinyal banyaknya besi di sirkulasi, keadaan eritropoiesis dan ada tidaknya proses inflamasi. Hepsidin akan mengatur jumlah besi yang dapat masuk dari enterosit dan besi yang dapat keluar dari cadangan di makrofag sehingga dapat digunakan oleh sel tubuh lain. Jumlah besi berlebih di sirkulasi akan menyebabkan besi terikat pada TFR-2-HFE dan hepcidin (HJV). Terjadi sinyal sehingga sel hati akan meregulasi produksi hepsidin oleh hepatosit berikutnya. Pada keadaan defisiensi besi atau hipoksia, hepsidin hanya diproduksi dalam jumlah sedikit sehingga banyak besi yang akan masuk ke sirkulasi dari enterosit maupun makrofag. Besi akan dibawa ke sumsum tulang dan dipergunakan untuk eritropoiesis. Bila kebutuhan besi sudah cukup maka akan terjadi umpan balik ke hati sehingga hepsidin dapat diproduksi lebih banyak untuk mengurangi masuknya besi ke dalam sirkulasi terutama melalui enterosit.²⁸



Gambar 2.17. Pengaturan besi oleh hepsidin. (Sumber: dari referensi 28)

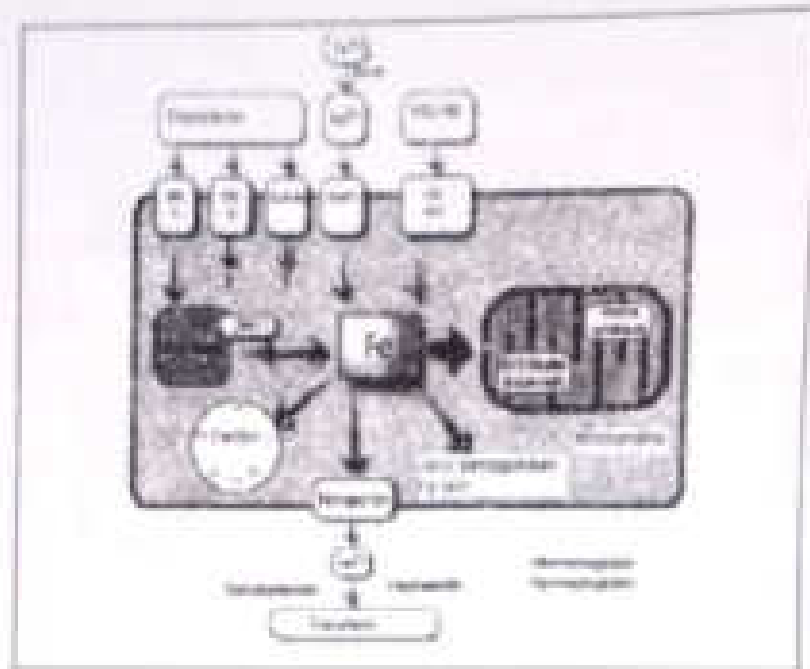
Pada keadaan kelebihan besi dan inflamasi, hepsidin akan diproduksi dalam jumlah banyak oleh hati dan akan mengakibatkan berkurangnya besi yang dapat masuk melalui enterosit atau menghalangi besi keluar dari makrofag. Pada hemokromatosis herediter terjadi kesalahan pada respons sinyal besi dari sirkulasi sehingga hepsidin hanya sedikit diproduksi hati. Akibatnya tetap terjadi absorpsi besi meskipun telah terjadi kelebihan besi tubuh (gambar 2.17).²⁸



Gambar 2.18. Regulasi ekspresi ferroportin oleh hepsidin di basolateral enterosit.
Dikopi dari Kapotakaan 48

Hepsidin bekerja pada target reseptornya, yaitu ferroportin. Ferroportin terdapat pada membran basolateral enterosit, makrofag, hepatosit, sel syaraf serta sel sinitiofibros pada plasenta. Hingga saat ini ferroportin merupakan satu-satunya pintu keluar besi dari sel ke sirkulasi yang diketahui. Pada keadaan normal, bila terdapat hepsidin, maka ferroportin ekspresinya berkurang karena akan mengalami internalisasi dan degradasi. Pada keadaan defisiensi Fe (kiri) produksi hepsidin disupresi dan ferroportin dapat banyak terekspresi. Pada keadaan ini terjadi

absorpsi besi secara maksimal. Bila besi cukup atau berlebih (tanan), maka hati akan memproduksi lebih banyak hepsidin. Hepsidin menyebabkan endositosis ferroporin sehingga terdegradasi. Esterosit yang penuh besi akan lepas saat masa hidupnya berakhir dan keluar melalui saluran cerna sebelum besi yang terkandung di dalamnya dapat masuk ke sirkulasi (gambar 2.18).⁴⁰



Gambar 2.18. Berbagai reseptor besi pada sel manusia. Diadaptasi dari pengetahuan di

Meskipun besi dapat masuk ke dalam sel tubuh melalui berbagai reseptor, seperti TFR1, TFR2, DMT1, CD 163 serta diduga masih ada reseptor lain yang belum teridentifikasi (gambar 2.19) tetapi sampai saat ini hanya dikenali adanya 1 pintu keluar besi dari dalam sel, yaitu ferroporin. Oleh karena itu, peran hepsidin terhadap ferroporin sangat penting dalam proses homeostasis besi tubuh.⁴⁰

2.4. HEMOKROMATOSIS

2.4.1. Hemokromatosis herediter

Hemokromatosis herediter adalah suatu kelainan genetik yang diturunkan secara autosomal resesif, terdapat dengan frekuensi yang cukup tinggi di Eropa utara. Kelainan ini merupakan *iron loading disorders* yang ditandai dengan adanya deposit besi berlebih di parenkim berbagai organ yang akan menimbulkan kerusakan jaringan dan organ tersebut. Pada tahun 1889 von Recklinghausen pertama kali melaporkan penggunaan pewarnaan Perle Blue Prusia untuk pigmen besi pada penderita hemokromatosis yang diduga mengalami pengendapan besi pada berbagai organ. Pada awalnya diagnosis dibuat saat autopsi.^{29,31}

Pada hemokromatosis ini dijumpai adanya peningkatan besi tubuh secara gradual progresif serta peningkatan besi serum akibat transfer besi yang tidak terkontrol dari usus dan makrofag. Hal ini akan menyebabkan kelebihan muatan besi dan kerusakan multi organ. Mutasi pada salah satu dari gen yang berperan pada metabolisme besi yaitu HFE, TFR2 (mengatur protein pengimpert besi transferin reseptor 2), HJV (mengatur hemojuvelin), dan HAMP, akan mengakibatkan kelebihan besi. Pada adult onset hereditary hemochromatosis, disebabkan kelainan pada HFE dan TFR2, terjadi penambahan besi secara lambat, sedangkan tipe juvenile onset hereditary hemochromatosis, dihubungkan dengan gangguan pada gen HJV dan HAMP, terjadi penimbahan besi secara cepat dan progresif.^{29,30}

Kelainan ini sering dihubungkan dengan adanya mutasi pada HFE protein pada C282Y, yaitu suatu *single base transition of tyrosine for cysteine* pada posisi 282. Hepudin memegang peran penting pada kelainan ini, karena ia merupakan regulator negatif bagi keaharannya besi dari enterosit dan makrofag. Berkurangnya

hepatin akan berakibat hilangnya kontrol pelepasan besi oleh sel tersebut, terjadi kelebihan besi di sirkulasi. Terjadi kelainan yang berat seperti pada *juvenile hereditary hemochromatosis*.^{18,19}

Pada pemeriksaan penyaring batasan kadar saturasi transferin > 55% untuk laki-laki atau > 50% pada wanita dianggap terdapat hemokromatosis dan perlu dilakukan penanganan lebih lanjut.¹⁴

2.4.2. Kelebihan besi sekunder

Kelebihan besi yang terjadi pada talasemia bersifat multifaktorial. Kelebihan besi terjadi akibat absorpsi besi yang meningkat melalui enterosit akibat eritropoiesis inepektif serta transfusi berulang. Hal yang sama akan terjadi pada anemia kronik lain yang tergantung transfusi. Pada penderita anemia dengan eritropoiesis yang inepektif absorpsi besi lebih banyak akibat hipoksia intestinal.²⁴ Pada penderita talasemia berat yang tak mendapat transfusi terdapat peningkatan absorpsi besi yang akan mengakibatkan peningkatan jumlah besi tubuh, dalam keadaan berat dapat menyebabkan peningkatan 2-5 g Fe/tahun.^{16,21} Peningkatan besi akibat absorpsi memegang peran lebih besar untuk terjadinya kelebihan besi dibandingkan dengan kontribusi besi akibat transfusi hingga mencapai konsentrasi yang membahayakan.¹² Akibat pemberian transfusi akan terjadi derajat peningkatan cadangan besi tubuh yang dua kali lebih besar. Biasanya gejala akibat peningkatan tersebut baru terlihat pada dekade kedua pada penderita yang tidak mendapat terapi kelasi. Pada penderita talasemia mayor, 1 tahun pasca transfusi sudah dapat dijumpai adanya deposit besi pada sel parenkim tubuh, hal ini berakibat lebih buruk dibandingkan peningkatan Fe di sel retikuloendotelial.^{2,43}

Pada penderita talasemia intermedia, derajat peningkatan absorpsi besi di gastrointestinal tidak begitu tinggi dibanding pada penderita talasemia mayor. Derajat peningkatannya diperkirakan sama dengan pada penderita hemokromatosis herediter homozigot. Peningkatan besi di hati lebih cepat dibandingkan dengan derajat peningkatan feritin serum.²

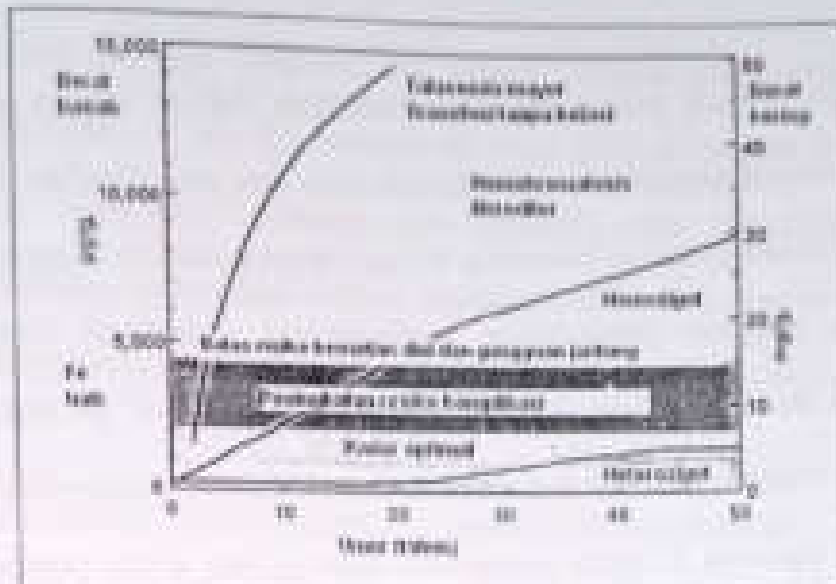
Terdapat 2 *labile iron pool* dalam tubuh, yaitu *intracellular iron labile pool* yang berasal dari katabolisme feritin dalam lisosom dan *uptake besi*. *Labile intracellular iron pool* yang berasal dari *uptake besi* masuk sebagai besi transferin atau non transferin ke dalam sel. Hepatosit adalah sel tempat penyimpanan utama besi tubuh pada keadaan kelebihan besi, dan jumlah besi dalam hati mencerminkan jumlah total cadangan besi tubuh. Jumlah total cadangan besi tubuh (mg/kgBB) = 10,6 x konsentrasi besi hati (mg/g berat keringnya). Oleh karena itu sel hati biasanya merupakan target utama pada pemberian terapi kelasi untuk besi.¹ Sumber besi lain adalah dari hasil katabolisme eritrosit dalam makrofag. Pada orang normal makrofag di hati, limpa dan sumsum tulang akan melepaskan 20 mg Fe/hari. Jumlah ini akan meningkat pada eritropoiesis yang tidak efektif, tetapi berkurang pada hipertransfusi pada talasemia. Pada kelebihan besi akibat transfusi transferin akan mengalami saturasi, sehingga akan terbentuk besi bebas yang lebih di sirkulasi (*labile plasma iron pool, LPI*) atau *non transferrin bound iron (NTBI)* di plasma.^{16,17}

Bila penambahan besi berlangsung terus, maka kemampuan transferin untuk mengikat dan detoksifikasi Fe akan terlampaui, sehingga fraksi besi yang bebas (tidak terikat transferin) akan mengakibatkan timbulnya hidroksi radikal bebas yang dapat menimbulkan kerusakan jaringan (*oxygen related damage*). Bila

penderita mendapat chelating agent maka besi bebas tersebut akan diklat dan mengurangi terjadinya radikal bebas. Batasan kadar besi yang aman untuk setiap organ tidak sama. Dikemukakan bahwa kematian langsung akibat kelebihan besi sekunder adalah akibat gangguan pada jantung. Peningkatan besi di hati lebih dari 15 mg/g berat keringnya dihubungkan dengan risiko tinggi adanya toksisitas pada jantung.^{5,67}

Akumulasi besi akan mengakibatkan disfungsi progresif jantung, hati dan organ endokrin. Sebagai respon terhadap adanya penimbunan besi, misoin in vitro akan meningkatkan terbentuknya NTBI, sehingga akan memperburuk penumpukan besi di jantung, dan akan menyebabkan hipertrofi, dilatasi, degenerasi serat miokardium, terkadang juga fibrosis. Pada penderita talasemia yang ditransfusi tanpa kelat, gejala pada otot jantung akan dijumpai 10 tahun pasca transfusi. Gejala dapat diperberat dengan timbulnya miokarditis dan hipertensi pulmonal (gambar 2.20).^{16,41,71}

Penyebab kematian lain adalah akibat gangguan fungsi hati. Setelah mendapat transfusi selama 2 tahun akan dapat dijumpai pembentakan kolagen, steosis portal dan bila tidak dilakukan kelat maka terjadi sirosis hati pada 10 tahun pertama. Secara in vitro dijumpai juga adanya supregulasi transport NTBI di hepatosit dan akan mempercepat penimbunan besi di dalam sel. Adanya penumpukan besi dalam kelenjar hipofisis anterior akan menyebabkan gangguan menses seksual pada 30% kasus perempuan dan laki-laki. Diabetes melitus dijumpai pada 5% kasus dewasa. Deposit mineral pada tiroid, paratiroid, kelenjar adrenal dan kelenjar ekskresi pankreas dapat menimbulkan hipertensi pulmonal, dilatasi ventrikel kanan serta gangguan fungsi paru.⁴¹



Gambar 2.20. Hubungan antara jumlah cadangan besi tubuh dengan kemungkinan komplikasinya. (Data dari Suparman et al)

2.4.3. Efek kelebihan besi terhadap sel

Adanya stres oksidatif secara terus menerus diperkirakan dapat menyebabkan gangguan pada intrasel, termasuk asam nukleat, protein, lipid dan membran sel akibat hilangnya pertahanan anti oksidan sel. Berbagai kerusakan pada organ tubuh terjadi seiring dengan meningkatnya jumlah besi tubuh. Kerusakan yang sering terjadi adalah pada jantung, hipofisis, hati serta juga dilaporkan menyebabkan kematian.^{17(a)} Mukosa gastrointestinal terus menerus akan terpapar terhadap oksidan yang masuk bersama makanan. Hal ini akan menyebabkan gangguan pada mukosa usus. Besi adalah salah satu mineral yang berperan pada pembentukan radikal oksigen, berperan melalui reaksi Haber Weiss serta memulai serta memperbanyak terbentuknya peroksidasi lipid terutama pada keadaan kelebihan besi dengan banyaknya besi bebas NTB di sirkulasi.¹⁷

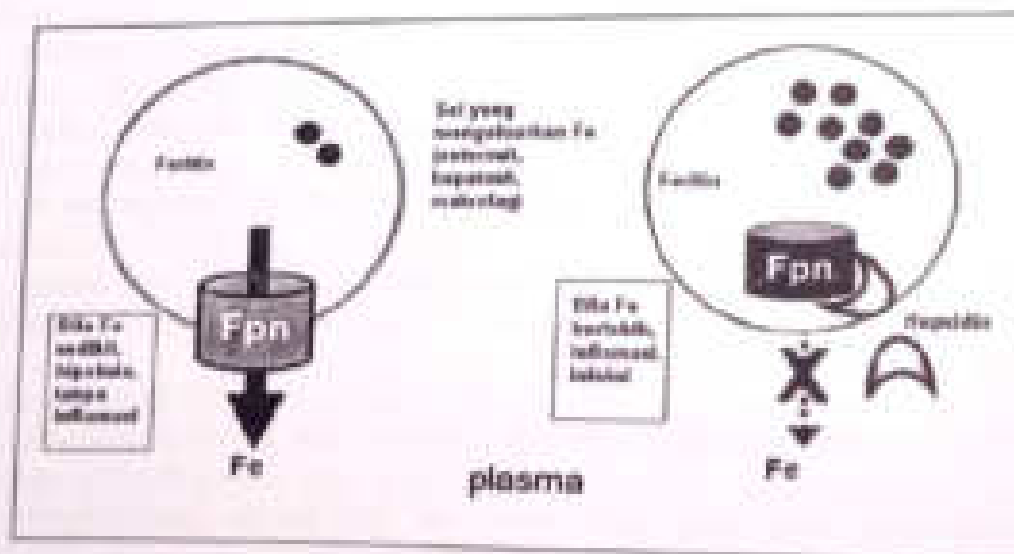
Coutois melaporkan adanya perubahan pada sel bila dilakukan pemberian Fe^{2+} eksogen yang akan mengaktifkan peroksidasi lipid dan gangguan integritas transport lemak serta berkurangnya transport glukosa melalui jalur sodium

coronary. Terjadi peningkatan malondialdehida (MDA) sebagai petanda adanya reaksi lipid peroksidatif, setara dengan kadar besi yang diberikan. Hal ini akan menyebabkan gangguan intracelular di usus berupa perubahan transport lipid ke plasma, gangguan pembentukan apolipoprotein, esterifikasi lipid dan metabolisme sterol di saluran empedu. Gangguan peroksidatif ini juga akan mengganggu transport elektrolit, *trace metals*, vitamin dan mikromotrien lain.¹⁷

Pada talasemia β terjadi peningkatan absorpsi besi akibat peningkatan eritropoiesis dan menyebabkan keadaan kelebihan besi. Pada tikus keadaan ini akan mengakibatkan peningkatan ekspresi enzim SI di usus sebagai akibat toksitas besi. Diperkirakan bahwa terbentuknya oksigen spesies reaktif akan mengaktifasi suatu *transcription protein* (Cdx-2) yang juga meregulasi transkripsi gen SI.²²

2.4.4. Kelebihan besi dan inflamasi

Pada keadaan infeksi dan inflamasi, tubuh berupaya untuk mengurangi adanya besi dalam sirkulasi. Hepsidin berperan penting dalam pengaturan ini.



Gambar 2.21. Regulasi besi tubuh pada keadaan tanpa inflamasi dan dengan inflamasi-infeksi.²³ Adaptasi dari pengetahuan Fe

Pada keadaan inflamasi dan infeksi terdapat peningkatan hepsidin sehingga keluarnya besi dari berbagai sel tubuh yang merupakan eksporir besi (enterosit duodenum, makrofag dan hepatosit) akan berkurang. Hal ini mengakibatkan ketersediaan besi di sirkulasi menjadi berkurang dan tak dapat dipergunakan oleh mikroorganisme dalam metabolismenya (gambar 2.21).¹⁸

2.5. PANKREAS DAN FUNGSINYA DALAM PENCERNAAN

Pankreas adalah suatu organ yang terletak membujur di belakang peritoneum parietalis dinding posterior abdomen. Pankreas terbagi menjadi bagian kepala, leher, badan dan ekor. Pankreas mempunyai 2 fungsi, yaitu sebagai kelenjar eksokrin dan endokrin.¹⁸

Sebagai kelenjar eksokrin pankreas terdiri dari bagian asinus, duktus serta jaringan lain yang meliputi lebih dari 80% berat totalnya. Asinus terbentuk dari sel piramidal dengan bagian apeksnya menghadap ke arah lumen sentral. Lumen adalah permulaan suatu duktus sekretorius, beberapa duktus sekretorius akan membentuk duktus intralobular dan interlobularis. Sel asiner merupakan sumber enzim pankreas yang namanya akan disekresikan dalam bentuk inaktif ke dalam duktus utama Wirsprung yang bergabung dengan duktus bifaris untuk menyekresikan isinya ke duodenum.¹⁸

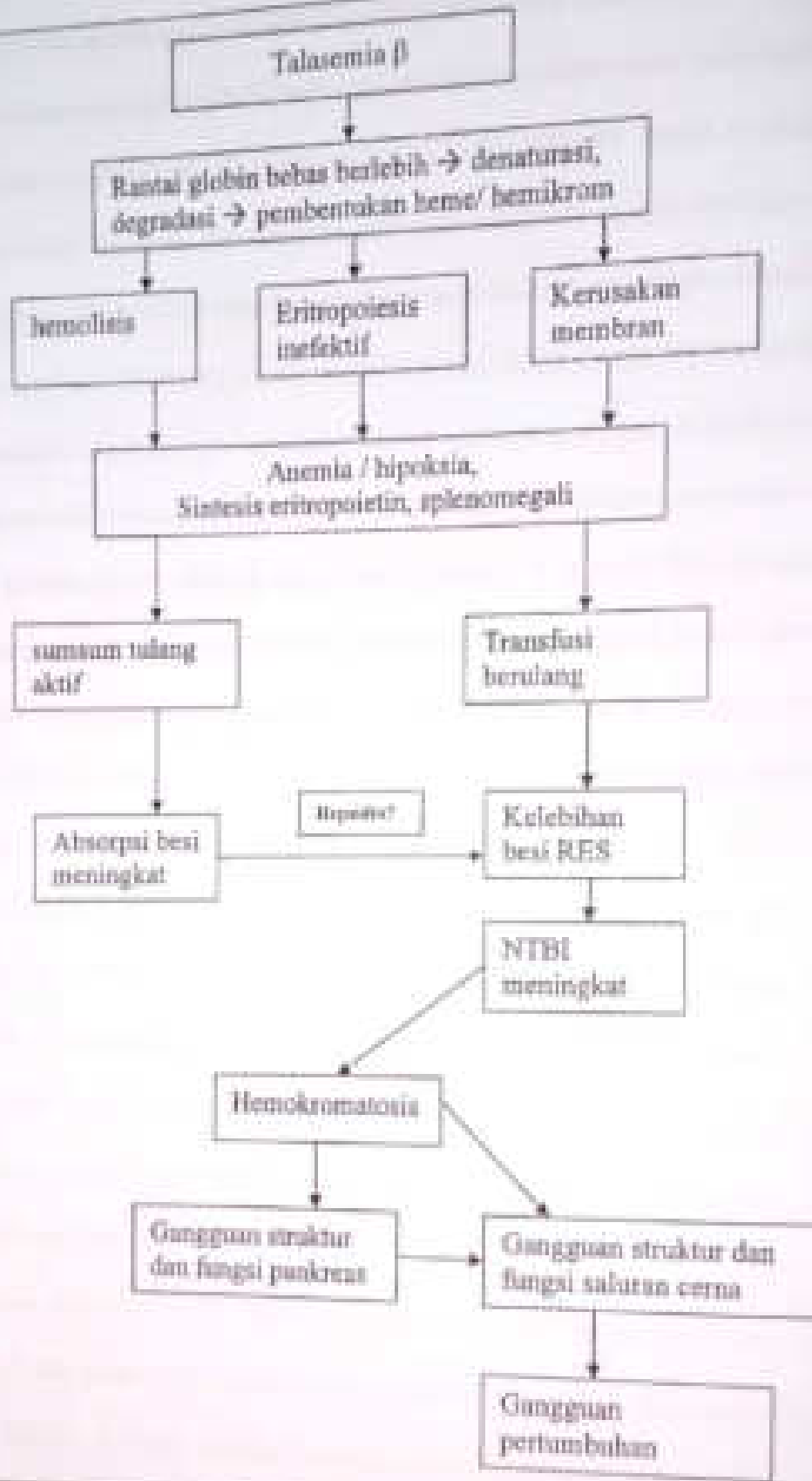
Kelenjar endokrin pankreas akan menyekresi enzim digestif dan cairan yang mengandung elektrolit. Pankreas akan menyekresikan sebanyak 2,5 l. cairan ke dalam duodenum setiap harinya. Enzim pankreas disintesis di dalam retikulum endoplasmik sel asiner dalam bentuk inaktif untuk mencegah terjadinya autohidrolisis kelenjar pankreas sendiri. Enzim yang terbentuk terutama digunakan untuk digesti

karbohidrat, protein dan lemak. Proses yang disekresi oleh pankreas dan teraktivasi di duodenum adalah tripsinogen, kimotripsinogen, prokarboksipeptidase A/B, and proelastase. Tripsinogen diubah oleh enterokinase menjadi tripsin dan tripsin yang terbentuk akan mengubah proenzim lain menjadi bentuk aktif. Endopeptidase akan memecah protein pada suatu asam amino tertentu. Di dalam duodenum enzim ini akan mendigesti protein menjadi oligopeptida yang akan dicerna lebih lanjut oleh enzim usus sebelum diabsorpsi. Amilase disekresi oleh pankreas serta kelenjar ludah. Proses pencernaan karbohidrat dimulai dengan proses digestif oleh amilase air ludah dan dilanjutkan dengan amilase pankreas membentuk polisakarida yang akan dicerna lebih lanjut oleh enzim usus sebelum diabsorpsi. Lipase akan memecah trigliserida dalam makanan menjadi asam lemak dan monogliserida. Lipase akan bekerja bersama dengan asam empedu dan kolipase. Asam lemak akan berfungsi sebagai emulsifier untuk memecah trigliserida dan kolipase akan membentuk kompleks bermamunya untuk memudahkan lipase bekerja. Fosfolipase A mengubah fosfatidilkinin menjadi asam lemak bebas dan laosofosfatidilkolin. Karboksiproteinase bekerja pada kolesterol ester, trihidromonogliserida serta ester lipid lain. Gangguan pada fungsi pankreas akan menyebabkan gangguan digestif karbohidrat, protein dan lemak serta menyebabkan nutrisi tersebut tak dapat diabsorpsi dengan baik, terjadi malabsorpsi dan dapat dideteksi dengan melakukan berbagai pemeriksaan laboratorium.¹⁴

Beberapa parameter telah dikenal untuk mendeteksi gangguan fungsi pankreas, antara lain pankreasitimin, pankreolaureat, jumlah lemak tinja, sisa amilum tinja, fungsi tripsin di tinja, aktivitas amilase, lipase dan tripsin serum serta polipeptida pankreatik. Akhir-akhir ini dikenal pemeriksaan elastase tinja, suatu

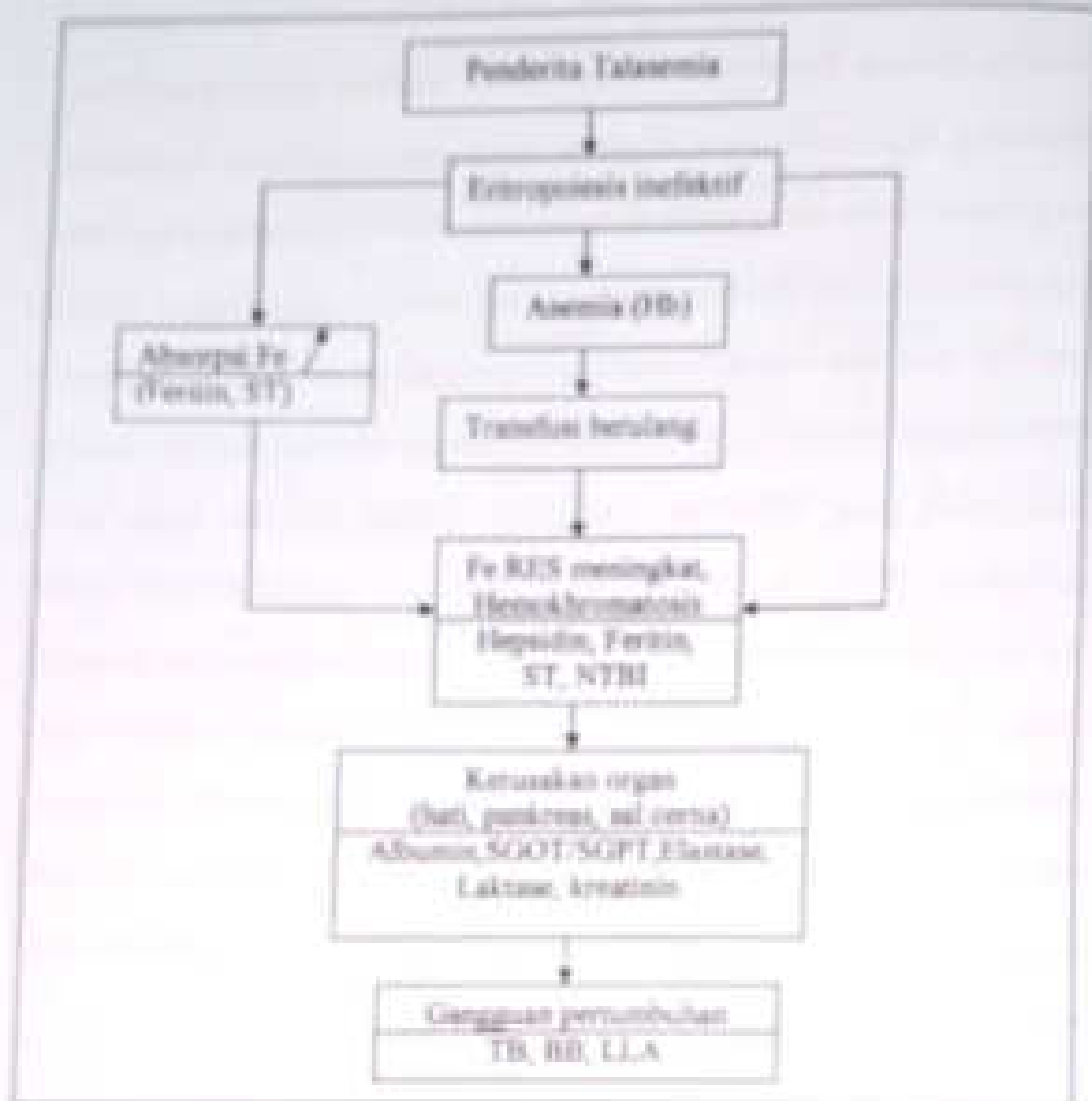
enzim proteolitik pankreas spesifik. Enzim ini memiliki aktivitas pada protein, khususnya terhadap gugur karboksil pada asam amino alanin, valin dan leusin. Disebut sebagai enzim elastolitik pankreas. Dalam keadaan normal kadarnya berkisar antara 170-360 ug/mL, yaitu sejumlah 6% dari seluruh enzim pankreas yang disekresikan. Pada saat melewati usus, elastase (E1) ini terikat pada garam empedu, enzim ini tidak mengalami degradasi selama di usus sehingga kadarnya di sana mencapai 5-6 kali kadarnya di pankreas. Enzim E1 ini digunakan untuk mendeteksi adanya gangguan fungsi pankreas. Aktivasinya menurun sejalan dengan penurunan fungsi pankreas, mendahului penurunan amilase maupun lipase pankreas.^{77,78} Elastase ini juga digunakan untuk menilai fungsi pankreas pada bayi baru lahir.⁷⁹ Lembar pada penelitiannya dari 13 penderita talasemia mayor yang mendapat transfusi beridung tetapi belum mengalami hemokromatosis mendapatkan adanya penurunan E1 tinja sebesar 20,3%.⁷⁹

KERANGKA TEORI



Pada penderita talasemia terjadi eritropoiesis yang tidak efektif akibat ketidakseimbangan pembentukan rantai globin. Hal tersebut menyebabkan terjadinya hemolisis eritrosit dan anemia. Derajat anemia diketahui dengan pemeriksaan hematologi lengkap. Penderita talasemia mayor mempunyai kadar hemoglobin yang sangat rendah sehingga terjadi peningkatan aktivitas eritropoiesis serta juga memerlukan transfusi berulang. Pada penderita tersebut sering dijumpai adanya kelebihan besi atau hemokromatosis serta peningkatan besi bebas di plasma, akibat absorpsi besi usus yang meningkat dan transfusi berulang. Hemokromatosis yang terjadi dapat dilihat dari peningkatan saturasi besi dan feritin serta peningkatan NTBI. Aktivitas absorpsi besi di usus dipengaruhi oleh kadar hepsidin. Hemokromatosis yang terjadi mengakibatkan gangguan fungsi berbagai organ, antara lain hati, pankreas serta saluran cerna. Gangguan tersebut dapat dideteksi dengan pemeriksaan fungsi hati (SGOT/SGPT), pankreas (elastase tinja), serta fungsi absorpsi usus (laktosa). Gangguan fungsi organ tersebut akan mengakibatkan gangguan pertumbuhan yang dapat dilihat pada kurangnya berat badan dan tinggi badan.

2.7. KERANGKA KONSEP



□ = yang sering diperiksa, parameter yang diperiksa

Pada penderita talasemia terjadi eritropoiesis tidak efektif dan anemia (pemeriksaan hematologi lengkap). Jika dilakukan transfusi berulang, dari pemeriksaan saturasi transferrin (ST), ferritin, hepsidin dan NTBI dapat diketahui adanya hemosiderosis sekunder. Untuk mengetahui kerusakan organ (hati, pankreas, saluran cerna) dilakukan pemeriksaan fungsi hati (SGOT/SGPT), pankreas (elastase tinja), serta fungsi absorpsi usus (laktase urin). Hal tersebut dapat mengakibatkan gangguan pertumbuhan (TB, BB).

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

3.1. DESAIN

Untuk menjawab hipotesis digunakan desain berupa studi *cross sectional*.

3.2. TEMPAT DAN WAKTU PENELITIAN

Penelitian dilakukan di Departemen Ilmu Kesehatan Anak, Patologi Klinik FKUI-RSCM, Lembaga Biologi Molekular Eijkman Jakarta dan Eijkman-Winkler Center, University Medical Center, Utrecht serta Departemen Farmasi FMIPA-UI, dalam periode Maret 2006 sampai dengan Juni 2007.

3.3. POPULASI PENELITIAN DAN PENGAMBILAN SAMPEL

Populasi target penelitian ini adalah penderita talasemia β mayor baru dan yang telah mendapat transfusi berulang di Pusat Talasemia RS Cipto Mangunkusumo Jakarta, periode Mei 2006 sampai dengan Oktober 2006. Penderita talasemia baru tanpa kelebihan besi akan dimasukkan dalam kelompok kontrol. Sedangkan kelompok talasemia dengan kelebihan besi akan dimasukkan dalam kelompok penderita. Penentuan *subyek* dilakukan secara konsekutif pada penderita yang memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi.

Pengambilan sampel dilakukan sesuai dengan jumlah yang diperlukan untuk masing-masing parameter. Dalam menentukan estimasi besar sampel diperlukan nilai proporsi kelainan yang ada pada kelompok penderita talasemia di populasi, tetapi karena belum dijumpai nilai proporsi di kepustakaan, maka dilakukan penelitian pendahuluan.

3.4. PENELITIAN PENDAHULUAN

3.4.1. Penelitian pendahuluan untuk elastase

Pada penelitian pendahuluan ini dilakukan pemeriksaan terhadap elastase - E1 tinja pada 21 penderita talasemia tanpa kelebihan besi. Sebagai batas untuk menentukan nilai normal digunakan kadar E1 sebesar 200 mg/g.^{28,29} Subyek dengan hasil elastase < 200 mg/g dianggap abnormal rendah.

3.4.2. Penelitian pendahuluan untuk laktase

Penelitian pendahuluan untuk menentukan proporsi kelainan enzim laktase pada penderita talasemia dilakukan dalam 3 tahap :

1. Proses validasi pemeriksaan laktosa laktulosa dengan menggunakan metoda Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT, *High Performance Liquid Chromatography - HPLC*).
2. Penentuan nilai rujukan laktase: dilakukan pemeriksaan laktase yang dihitung dari rasio laktosa laktulosa pada 20 subyek sehat. Hasilnya digunakan sebagai batas rujukan untuk menentukan adanya laktase yang abnormal.
3. Perhitungan proporsi kelainan laktase pada 15 subyek kontrol dengan talasemia tanpa kelebihan besi. Proporsi subyek dengan laktase (rasio laktosa laktulosa) abnormal yang diperoleh akan digunakan untuk perhitungan estimasi jumlah sampel yang sebenarnya.

3.4.3. Penelitian pendahuluan korelasi saturasi besi dan NTBI terhadap elastase dan laktase

Penelitian pendahuluan untuk menentukan korelasi antara saturasi besi dan NTBI terhadap elastase dan laktase (rasio laktosa laktulosa) dilakukan terhadap 15 subyek penelitian untuk perhitungan estimasi besar sampel.

3.5. ESTIMASI BESAR SAMPEL

Rumus estimasi besar sampel untuk elastase tinja dan laktase :

$$n1=n2= \left\{ \frac{Z_{\alpha} \sqrt{PQ} + Z_{\beta} \sqrt{P1Q1 + P2Q2}}{d} \right\}^2$$

- n = jumlah sampel
- P1 = proporsi kelainan pada kelompok kontrol (talasemia tanpa hemokromatosis)
- P2 = proporsi kelainan pada kelompok pasien (talasemia dengan hemokromatosis)
- P = (P1+P2)/2
- Q1 = 1 - P1
- Q2 = 1 - P2
- Q = (Q1 + Q2)/2
- d = perbedaan proporsi minimal yang dianggap bermakna antara kelompok pasien dan kontrol
- Z α = derajat kepercayaan (95%)
- Z β = power (80%)

Proporsi penderita talasemia tanpa hemokromatosis belum banyak dijumpai di telaah patika, oleh karena itu dilakukan penelitian pendahuluan untuk mendapatkan nilai P1 untuk perhitungan nilai sampel yang sebenarnya.

3.5.1. Perhitungan untuk elastase

Dari pemeriksaan pendahuluan didapatkan proporsi penderita talasemia tanpa kelebihan besi yang mempunyai elastase abnormal adalah 0,2 (lihat lampiran 4). Didapatkan nilai P1 adalah 0,2 dengan perkiraan d 0,25. Perhitungan estimasi besar sampel untuk elastase adalah sebagai berikut:

P elastase : $P1 = 0,20$; $d : 0,25$; $P2 = 0,2 + 0,25 = 0,45 \rightarrow P = (0,2 + 0,45) / 2 = 0,325$

Q : $Q1 = 0,8$; $Q2 = 0,55 \rightarrow Q = (0,8 + 0,55) / 2 = 0,675$

z_{α} (pada $\alpha 0,05 \rightarrow -1,96$) $Z_{\beta} = 10\% \rightarrow 0,842$

$$n1 = n2 = \left\{ \frac{1,96 \sqrt{2 \times 0,325 \times 0,675} + 0,842 \sqrt{(0,2 \times 0,8) + (0,45 \times 0,55)}}{0,25} \right\}^2$$

$$n1 = n2 = 49$$

Bila diperkirakan kemungkinan kesulitan pengumpulan bahan pemeriksaan sebesar 20% maka jumlah subjek yang akan diambil adalah :

$$n' = 1 / (1 - 0,2) \times 49 = 65$$

Diambil 65 pasien/ kelompok

3.5.2. Perhitungan untuk laktase

Pemeriksaan laktase dilakukan dari perhitungan rasio laktosa/laktulosa di urin yang diperiksa menggunakan metoda Kromatografi Cair Kinerja Tinggi. Dari hasil penelitian pendahuluan didapatkan proporsi penderita talasemia tanpa kelebihan besi dengan laktase rendah adalah 0,6 (lihat lampiran 4). Didapatkan nilai $P1$ adalah 0,6 dengan perkiraan d 0,25. Perhitungan estimasi besar sampel untuk laktase (rasio laktosa laktulosa) adalah sebagai berikut:

$P1 = 0,6$; $d : 0,25$; $P2 = 0,6 + 0,25 = 0,85 \rightarrow P = (0,6 + 0,85) / 2 = 0,725$

$Q1 = 0,4$; $Q2 = 0,15 \rightarrow Q = (0,4 + 0,15) / 2 = 0,275$

z_{α} (pada $\alpha 0,05 \rightarrow -1,96$) $Z_{\beta} = 10\% \rightarrow 0,842$

$$n1 = n2 = \left\{ \frac{1,96 \sqrt{2 \times 0,725 \times 0,275} + 0,842 \sqrt{(0,6 \times 0,4) + (0,85 \times 0,15)}}{0,25} \right\}^2$$

$$n1 = n2 = 48$$

Bila diperkirakan kemungkinan kehilangan sampel sebesar 20% maka jumlah subjek yang akan diambil adalah :

$$n' = 1 / (1 - 0,2) \times 48 = 60$$

Diambil 60 pasien/ kelompok

3.5.3. Perhitungan untuk uji korelasi antara masing-masing saturasi transferin dan NTBI terhadap elastase dan laktase :

$$N = \left\{ \frac{Z_{\alpha} + Z_{\beta}}{0,5 \ln (1+r)/(1-r)} \right\}^2 + 3$$

N = jumlah sampel

Z_α = tingkat kemaknaan (0,05)

Z_β = power (80%)

r = korelasi

Dari penelitian pendahuluan terhadap 15 penderita talasemia didapatkan nilai korelasi antara saturasi transferin dan NTBI dengan elastase dan laktase (rasio laktosa laktidosa) seperti pada tabel di bawah ini.

Tabel 3.1. Korelasi awal saturasi transferin dan NTBI terhadap elastase dan laktase

Parameter	Korelasi (r) (n=21)			
	Elastase	r	Laktase	r
Saturasi transferin	0,233	0,331	0,554	0,631
NTBI	0,088	0,711	0,247	0,395

Berdasarkan nilai r yang didapat dilakukan estimasi besar sampel yang diperlukan untuk masing-masing parameter.

3.5.3.1. Perhitungan untuk uji korelasi antara saturasi transferin dan elastase

$$N = \left\{ \frac{1,96 + 0,842}{0,5 \ln (1+0,233)/(1-0,233)} \right\}^2 + 3$$

$$N = 2,802 / (0,5 \ln 1,597) = 128$$

3.5.2. Perhitungan untuk uji korelasi antara aktivitas transferin dan albumin

$$N = \left\{ \frac{LM + 0,842}{0,58(t + 0,50)(1 - 0,50)} \right\}^2 - 3$$

$$N = 2,802 (0,58 \times 1,441) = 29$$

3.5.3. Perhitungan untuk uji korelasi antara NTBI terhadap elastase

$$N = \left\{ \frac{LM + 0,842}{0,58(t + 0,197)(1 - 0,197)} \right\}^2 - 3$$

$$N = 2,802 (0,58 \times 1,222) = 787$$

3.5.4. Perhitungan untuk uji korelasi antara NTBI terhadap laktase

$$N = \left\{ \frac{LM + 0,842}{0,58(t + 0,27)(1 - 0,27)} \right\}^2 - 3$$

$$N = 2,802 (0,58 \times 1,607) = 124$$

Jumlah sampel untuk uji korelasi antara NTBI terhadap elastase sangat besar ($n=787$) sehingga akan dilakukan perhitungan ulang sesuai dengan nilai t baru yang didapat melalui rumus sampel di atas.

3.6. KRITERIA INKLUSI DAN EKSKLUSI

3.6.1. Kriteria inklusi

Penderita diabetes II tahap baru dan penderita dengan transfusi darah yang berada di Pusat Talasemia Darah IKA FKUI-RSCM, bersedia berpartisipasi dalam penelitian ini.

3.5.3.2. Perhitungan untuk uji korelasi antara saturasi transferin dan laktase

$$N = \left\{ \frac{1,96 + 0,842}{0,5 \ln (1+0,56)/(1-0,36)} \right\}^2 + 3$$

$$N = 2,802 / (0,5 \ln 3,545) = 25$$

3.5.3.3. Perhitungan untuk uji korelasi antara NTBI terhadap elastase

$$N = \left\{ \frac{1,96 + 0,842}{0,5 \ln (1+0,1)/(1-0,1)} \right\}^2 + 3$$

$$N = 2,802 / (0,5 \ln 1,222) = 787$$

3.5.3.4. Perhitungan untuk uji korelasi antara NTBI terhadap laktase

$$N = \left\{ \frac{1,96 + 0,842}{0,5 \ln (1+0,25)/(1-0,25)} \right\}^2 + 3$$

$$N = 2,802 / (0,5 \ln 1,667) = 124$$

Jumlah sampel untuk uji korelasi antara NTBI terhadap elastase sangat besar ($n=787$) sehingga akan dilakukan perhitungan ulang sesuai dengan nilai r baru yang didapat setelah semua sampel dianalisis.

3.6. KRITERIA INKLUSI DAN EKSKLUSI

3.6.1. Kriteria inklusi

Penderita talasemia β mayor baru dan penderita dengan transfusi berulang yang berobat di Pusat Talasemia Bagian IKA FKUI-RSCM. Bersedia berpartisipasi dalam penelitian ini.

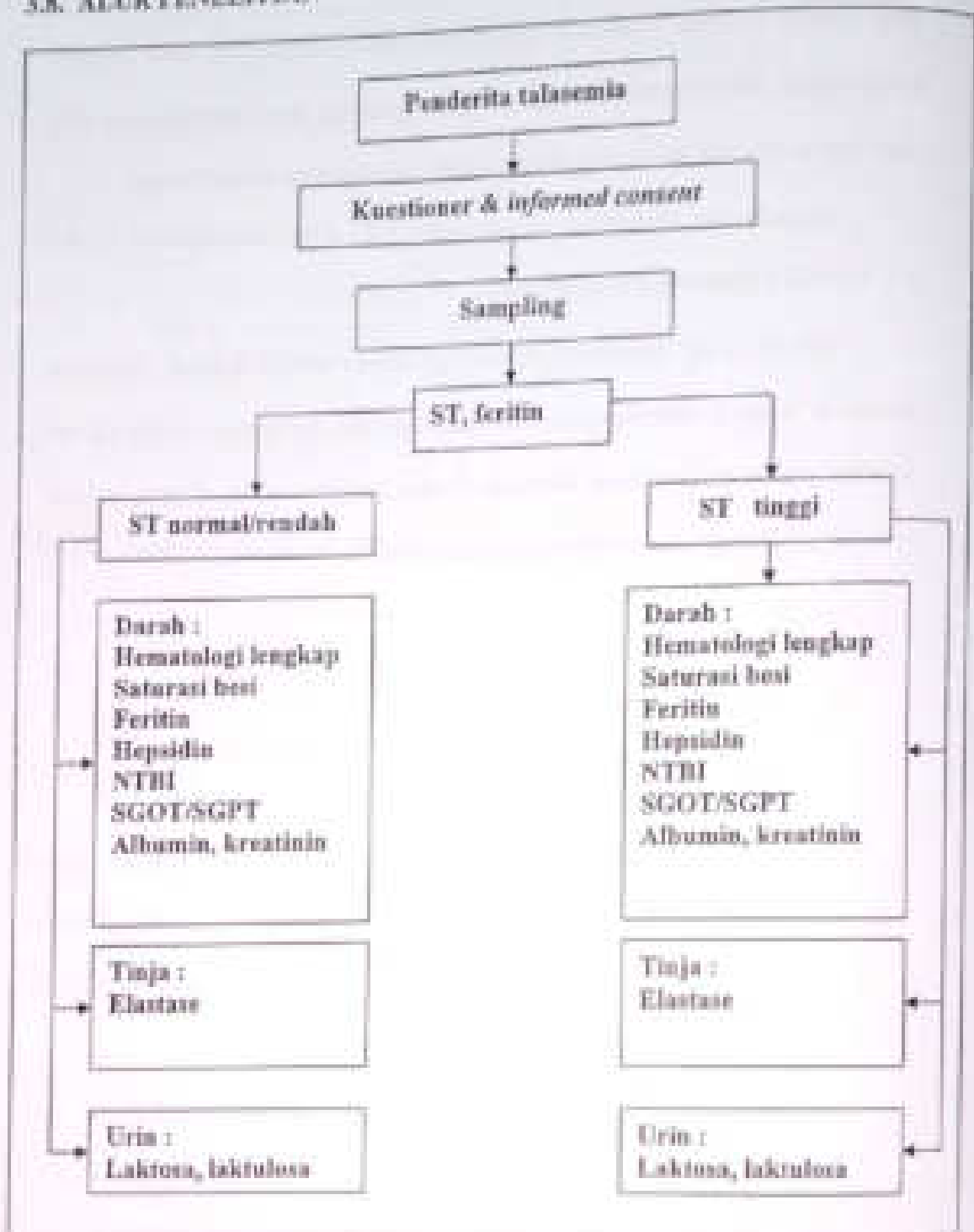
3.6.2. Kriteria eksklusi

Penderita talasemia β mayor baru dan penderita dengan transfusi berulang yang berobat di Pusat Talasemia Bagian IKA FKUI-RSCM yang tidak bersedia berpartisipasi dalam penelitian ini, menderita kelainan atau penyakit berat atau kemungkinan tidak lanjut sulit karena alasan keluarga atau tempat tinggal.

3.7. PENGELOMPOKAN SUBYEK

Subyek yang memenuhi kriteria penelitian dibagi menjadi kelompok talasemia tanpa hemosiderosis atas dasar saturasi transferin $< 55\%$ (belum kelebihan besi) dan kelompok talasemia dengan hemosiderosis, dengan saturasi transferin $\geq 55\%$ (telah mengalami kelebihan besi).¹⁴

3.8. ALUR PENELITIAN



ST = serum transferrin; NTBI = non-transferrin bound iron.

Penilaian terhadap :

1. Status hematologi : hematologi lengkap
2. Penimbunan besi : peningkatan saturasi transferin (ST), feritin, status hepsidin dan NTBI
3. Gangguan fungsi hati : peningkatan SGOT, SGPT, albumin
4. Defek pankreas: penurunan elastase tinja
5. Gangguan absorpsi: perubahan laktase dilihat dari kadar laktosa dan laktulosa urin. Syarat: fungsi ginjal baik, dinilai dari ureum dan kreatinin.

3.9. CARA KERJA

Bahan pemeriksaan berupa darah vena, urin dan tinja. Penderita diambil darah vena dalam keadaan puasa selama minimal 8 jam, kemudian diminta berkecambah. Darah vena akan digunakan untuk pemeriksaan laboratorium. Untuk pemeriksaan hematologi lengkap digunakan bahan pemeriksaan berupa darah K3-EDTA, untuk pemeriksaan tes fungsi hati, fungsi ginjal, parameter besi (besi serum, daya ikat besi total serum, saturasi besi, feritin dan status hepsidin) digunakan serum, untuk pemeriksaan elastase digunakan bahan tinja sewaktu. Pada pemeriksaan laktase, dilakukan pengumpulan urin setelah pembebanan laktosa dan laktulosa oral.

Penderita diminta datang dalam keadaan puasa minimal 4 jam, kemudian akan mendapat pembebanan dengan larutan yang mengandung laktosa dan laktulosa (dengan perbandingan sama 0,4 g/kg BB dan dilarutkan dalam air) untuk diminum. Penderita dapat minum air setiap 30 menit hingga 2 jam pasca pembebanan. Dilakukan penampungan urin mulai dari urin dalam keadaan puasa,

usia 2 jam hingga paling lama 4 jam pasca pembekuan. Urin dikumpulkan dan dibekukan (-20°C) untuk pemeriksaan laktosa/laktulosa.²⁸

Penderita juga diminta untuk memberikan sampel tinja sewaktu untuk pemeriksaan elastase EI tinja. Tinja akan disimpan hingga pemeriksaan dilakukan (-20°C).^{28,79,80}

3.10. PROSEDUR PEMERIKSAAN LABORATORIUM (Lampiran 5)

1. Pemeriksaan hematologi lengkap: *automated cell counter* Sysmex XT2000i.⁸¹
2. Pemeriksaan saturasi besi (*serum iron* dan *total iron binding capacity*): Reagen Behring, *automated chemical analyzer* alat Dimension AR (Dade Behring).⁸²⁻⁸⁴
3. Pemeriksaan ferritin: *micro enzyme immuno assay* (Elecrys 2010, Roche).⁸⁵
4. Pemeriksaan NTBI: *immuno assay - fluorometry*.⁸⁶
5. Pemeriksaan hepsidin serum : *micro enzyme immuno assay* (DRG, Organon Micro Reader).⁸⁷
6. Pemeriksaan SGOT, SGPT: kinetik, *automated chemical analyzer* (Hitachi 912).^{88,89}
7. Pemeriksaan albumin: kolorimetrik, *automated chemical analyzer* (Hitachi 912).^{90,91}
8. Pemeriksaan ureum, kreatinin: kolorimetrik, *automated chemical analyzer* (Hitachi 912).⁹¹⁻⁹³
9. Pemeriksaan elastase tinja : *enzyme immuno assay* (Schobo).⁹⁴
10. Pemeriksaan laktosa/laktulosa urin : pembekuan dengan laktosa (Bristolchem) dan Laktulosa (Kunze - Fahrenheit), pemeriksaan dengan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT- HPLC Shimadzu).²⁸

Pemeriksaan pendahuluan: kalibrasi alat yang digunakan, validasi pemeriksaan presisi (*within run/between run*) dan akurasi/penyimpangan.

3.10. 1. Pemeriksaan Elastase 1 pankreas di tinja⁸⁹

Pemeriksaan kadar elastase 1 pankreas dalam tinja dilakukan secara ELISA dengan *ScheBo[®] Pancreatic Elastase 1 Stool Test, Bestell-Nr/Catalog No. 07*.

Prinsip pemeriksaan :

Pemeriksaan ini berdasarkan *sandwich immunoassay*. Elastase-pankreas tinja dari sampel akan berikatan dengan antibodi 1 di lubang sumbu pada *plate*. Terbentuk kompleks antibodi 1-elastase. Antibodi ke 2 yang berlabel biotin mengikat EI tinja pada inkubasi berikutnya sehingga terbentuk kompleks antibodi 1-elastase - antibodi + biotin. Penambahan streptavidin dan peroksidase akan menyebabkan biotin terikat streptavidin dan peroksidase. Kompleks akan mengakibatkan oksidasi substrat ABTS (*abo-cil-benzotiazolin sulfonat*) dan menyebabkan terjadinya warna hijau tua. Perubahan warna yang terjadi setara dengan kadar EI tinja.

Reagensia :

Strip sumbu dengan lapisan antibodi monoklonal terhadap EI manusia

Konsentrat bufer pencuci mengandung bufer fosfat salin pH 7,2 dan detergen

Konsentrat bufer ekstraksi untuk tinja, mengandung bufer fosfat salin pH 7,2 dan *iodine aride*.

Larutan standar EI manusia dengan 5 kadar (15, 50, 100, 200 dan 500 ug/g)

Larutan kontrol EI manusia dengan kadar 200 ug/g \pm 10%.

Antibodi monoklonal EI yang terkonjugasi dengan biotin

Larutan POD-Streptavidin

Larutan reagen AHTS (*2,2'-azino-bis-(1-ethyl-benzothiazolin-6-sulfonic acid)*)

Larutan pengganti reagen

Persiapan bahan

Dilakukan pembuatan emulsi tinja dengan mencampurkan 100 mg tinja dengan 10 mL buffer ekstraksi. Dilakukan sentrifugasi untuk mendapatkan supernatan dengan konsentrasi akhir 10 mg tinja/mL. Bahan yang telah diekstraksi kemudian diencerkan 1:500

Prosedur pengukuran/penetapan kadar elastase 1 pankreas

1. Tinja yang sudah diencerkan (100 mg/10 mL) dimasukkan ke dalam sumur yang sudah dilapisi antibodi 1, sehingga terbentuk kompleks Ab-E1-elastase.
2. Kemudian ditambahkan antibodi 2 yang berlabel biotin membentuk kompleks Ab 1-E 1-Ab 2 bio (antibodi 1-elastase-antibodi 2 berlabel biotin).
3. Setelah diberi pewarna, dibaca dengan spektrofotometer.

Nilai rujukan elastase E1 pankreas \rightarrow 200mg/g tinja

3.10.2. Pemeriksaan aktivitas laktase²⁸

Pemeriksaan dilakukan dengan mengukur aktivitas laktase urin yang dinyatakan dalam rasio ekskresi laktulosa dan laktosa dalam urin. Penetapannya dilakukan dengan cara kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT). Pemeriksaan dilakukan di Departemen Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia Depok.

Prosedur penetapan kadar laktulosa dan laktosa

1. Sebanyak 1-1,5 mL urin dimasukkan ke dalam tabung dan dicampur dengan asetronitril dan mikroform (1:1:1), kemudian disentrifus dengan kecepatan

- 3.000 rpm selama lima menit. Lapian urin diambil dan diaring dengan cakram filter berukuran pori 0,22 μ m.
2. Dua puluh μ L urin yang sudah difiltrasi diinjeksikan ke dalam alat KCKT. Kolom untuk KCKT yang dipakai adalah kolom karbohidrat (Waters, 3,9 x 100 mm, Kat.no. WAT084058).
 3. Kadar laktulosa dan laktosa dalam sampel ditetapkan dengan cara membandingkan luas puncak atau tinggi puncak pada kromatogram dengan standar yang sudah dibuat.
 4. Dihitung rasio ekskresi laktulosa dan laktosa.
 5. Aktivitas laktase dinyatakan dengan rasio ekskresi laktulosa dan laktosa.

3.10.3. Pemeriksaan hepsidin²⁷

Pemeriksaan dilakukan dengan cara mikro elisa menggunakan kit Hepsidin (DRG instrument GmbH) no. 4015 dengan *microelisa reader* (Organon Technica).

Prosedur pemeriksaan:

1. Masukkan 50 μ L buffer ke dalam lubang mikroelisa
2. Masukkan 50 μ L standar hepsidin (masing-masing dengan kadar 0, 50, 100, 500, 1000, 2000 ng/ml), serum dan kontrol
3. Tambahkan 50 μ L biotin ke tiap lubang, kocok plate 10 detik, inkubasi 60 menit (suhu kamar)
4. Kocok dan cuci 3 x dengan larutan pencuci (400 μ L/lubang), keringkan dengan membaliknya pada kertas peryerap
5. Tambahkan 100 μ L streptavidin-HRP kompleks ke tiap lubang
6. Campur dan inkubasi 30 menit (suhu kamar)

7. Kocok dan cuci 3 x dengan larutan pencuci (400 μ L/lubang), keringkan dengan membaliknya pada kertas penyusap
8. Tambahkan 100 μ L substrat di tiap lubang (perhitungkan interval), inkubasi 10 menit (suhu kamar)
9. Tambahkan larutan penghenti reaksi sesuai interval pada no.8
10. Ukur serapan pada panjang gelombang 450 nm dalam waktu 30 menit menggunakan microplate reader
11. Gambarkan kurva absorpsi standar pada kertas semilogaritmik, baca nilai hepsidin serum sampel.

3.10.4. Pemeriksaan Non Transferrin Bound Iron (NTBI)²⁸

Pemeriksaan NTBI serum dilakukan dengan alat Fluorometry dengan metoda fluoresensi immunoassay. Pemeriksaan dilakukan di Laboratorium Eijkman - Winkler Center University Medical Center Utrecht.

Prosedur pemeriksaan :

1. Sebanyak 20 μ L serum dimasukkan dalam lubang sumbu mikro elisa secara duplikat. Sebanyak 20 μ L larutan standar 0-400 μ l dan kontrol juga dimasukkan ke dalam lubang sumbu
2. Dimasukkan 230 μ L larutan yang mengandung 100 mmol/L sodium oksalat, 20 mmol/L HEPES dan 2,5 mmol/L MnCl₂ dengan pH 7,4.
3. Pipet 100 μ L sampel yang telah diencerkan ke dalam lempeng mikro elisa yang telah dilapisi dengan deferoxamin, inkubasi selama 37°C.
4. Cuci dengan akuadestilata 2 kali, lalu bilas dengan 5 mmol/L EDTA pada pH 8,0.
5. Cuci kembali dengan akuadestilata sebanyak 2 kali

6. Tambahkan 0,1 mL Fe-kalsein dan 540 nmol/L ferro ammonium sulfat (FAS) dalam 20 mmol/L buffer HEPES, 150 mmol/L NaCl pada pH 7,3.
7. Inkubasi 2 jam pada 37°C.
8. Baca fluoresensi dengan fluorometer pada 485/538 nm. Kadar NTBI berbanding terbalik dengan fluoresensi yang terjadi.

3.11. BATASAN OPERASIONAL

1. Penderita talasemia β mayor adalah penderita talasemia yang telah didiagnosis dengan pemeriksaan klinis dan laboratorium sebelumnya sebagai penderita talasemia β mayor.
2. Anemia adalah bila kadar hemoglobin di bawah 12 g/dL.⁴⁴
3. Hemokromatosis adalah keadaan di mana kadar saturasi transferrin lebih besar atau sama dengan 55%.⁴⁴
4. Kelompok penderita adalah kelompok penderita talasemia β mayor pasca transfusi berdarang dengan hemokromatosis.
5. Kelompok kontrol adalah kelompok penderita talasemia β mayor yang belum ditransfusi dan kelompok pembawa sifat talasemia (talasemia *trait*) tanpa hemokromatosis, dengan kadar saturasi transferrin lebih kecil dari 55%.
6. Gangguan fungsi pankreas dinyatakan bila aktivitas elastase E-1 di bawah 200 mg/g tinja.
7. Gangguan fungsi usus berupa gangguan enzim dinyatakan bila kadar laktase (rasio laktosa/laktulosa) di bawah nilai kelompok kontrol.
8. Gangguan integritas usus halus dinyatakan bila kadar laktulosa urin lebih besar dibandingkan kelompok kontrol.

4. Ekspresi hepsidin diuraikan berdasarkan kadar hepsidin serum atau sebagai rasio hepsidin/feritin.

3.12. ANALISIS STATISTIK

1. Data deskriptif akan disajikan dengan statistik deskriptif (umur, jenis kelamin, jenis talasemia, kelengkapan transfusi, Hb, fungsi hati, pankreas dan fungsi usus kecil)
2. Perbedaan rerata antara 2 kelompok yang tidak berkaitan ditentukan dengan uji *t* atau Mann-Whitney.
3. Perbedaan proporsi antara 2 kelompok yang tidak berkaitan dianalisis dengan uji *chi square*.
4. Korelasi antara 2 variabel numerik dianalisis dengan uji analisis Pearson atau Spearman.
5. Nilai $p \leq 0,05$ dianggap berbeda secara statistik dan klinis.
6. Pembuatan kurva Receiver Operator Curve (ROC) digunakan untuk mengetahui titik potong dengan nilai sensitivitas dan spesifisitas.

3.13. ETIKA PENELITIAN

Orang tua penderita talasemia diminta persetujuannya secara tertulis setelah diberi penjelasan mengenai tujuan, manfaat dan kemungkinan terjadinya efek samping serta hak untuk menolak atau ikut serta dan kemungkinan pengalihan diri. Penelitian dilakukan setelah mendapat persetujuan panitia penilai etik.

BAB IV

HASIL PENELITIAN

4.1. SUBJEK PENELITIAN

Telah dilakukan penelitian mengenai pengaruh program terapi uluhum serta dan status hepatitis pada penderita talasemia mayor, yaitu mengenai elastase, albumin, bilirubin, hemoglobin antara sesama besi dan NTBI dengan program terapi uluhum serta serta status hepatitis. Pengumpulan bahan pemeriksaan dan penelitian dilakukan dalam periode bulan Mei 2006 hingga Juli 2007 di Pusat Talasemia - Departemen Ilmu Kesehatan Anak RS Cipto Mangunkusumo Jakarta.

Penderita talasemia dengan hemokromatosis berasal dari anak dengan talasemia β mayor yang telah mendapat transfusi darah berulang dan ditang untuk mendapat transfusi darah. Kelompok kontrol diambil dari penderita talasemia yang masih rawa, belum mendapat transfusi darah berulang dan belum mengalami kelebihan besi. Karena jumlah kelompok kontrol tidak didapat, sebagai subjek kontrol juga diambil keluarga dari penderita talasemia mayor yang menjadi subjek penelitian yaitu saudara kandung dan orang tua yang berlatar belakang pemeriksaan merupakan pembawa sifat talasemia (tabel 4.1).

Tabel 4.1. Subjek penelitian

Subjek penelitian	Kelompok penderita	Kelompok kontrol
	n	n
Talasemia dengan hemokromatosis	108	-
Talasemia tanpa hemokromatosis	-	14
Pembawa sifat talasemia	-	72

Subyek penelitian terdiri dari sejumlah 108 kelompok penderita talasemia dengan hemokromatosis dan 86 subyek sebagai kelompok kontrol. Kelompok kontrol terdiri dari 14 penderita talasemia tanpa hemokromatosis dan 72 subyek pembawa sifat talasemia. Penderita talasemia mayor dengan hemokromatosis terdiri dari 60 penderita laki-laki dan 48 penderita perempuan dengan rentang usia 1,2 - 23 tahun (rata-rata 8,1 tahun). Subyek kontrol terdiri dari 38 penderita laki-laki dan 48 penderita perempuan dengan rentang usia 2-49 tahun (median 32,0 tahun). Pada subyek penelitian dan kontrol telah dilakukan pengambilan bahan pemeriksaan berupa darah, urin dan tinja untuk pemeriksaan hematologi lengkap, status besi tubuh (saturasi transferin, ferritin dan NTBI), fungsi hati (SGOT, SGPT, albumin), kreatinin, elastase tinja dan laktosa- laktulosa urin.

Table 4.2. Karakteristik subyek penelitian

Karakteristik	Penderita hemokromatosis (n=108)		Kontrol tanpa hemokromatosis (n=86)	
	Rata-rata	Rentang nilai	Rata-rata	Rentang nilai
Usia (tahun)	8,1	1,2 - 23	32,0*	2 - 49
Berat badan (kg)	19,0*	8,3 - 30,3	50,0*	9,7 - 75,8
Tinggi Badan (cm)	117,3	68,5 - 165,0	156,0*	113,4 - 169,7
Saturasi transferin (%)	68,7	56,6 - 100,4	31,9	5,8 - 53,9
BMI	15,6	13,2 - 18,0	19,3	16,7 - 21,9*
Lama transfusi (bulan)	46,3	3,5 - 211,5	-	-
Jumlah darah Transfusi (ml.)	22.067*	200 - 133.010	-	-
Jumlah darah (bulan)(mL)	290,8	145,6 - 775,3	-	-
Rasio transfusi/berat badan (kg)	686,8	68,3 - 3.105	-	-

*Nilai sebagai median

* p < 0,001

Batasan untuk menentukan adanya hemokromatosis adalah kadar saturasi transferin serum, subyek dengan kadar saturasi transferin $\geq 55\%$ dimasukkan dalam kelompok pasien, sedangkan subyek dengan saturasi transferin $< 55\%$ dimasukkan dalam kelompok kontrol. Pada kelompok penderita talasemia dengan hemokromatosis didapatkan rentang kadar saturasi transferin 56,6-100,4% (rerata 68,7%), sedangkan pada kelompok kontrol didapatkan rentang nilai sebesar 5,8-53,9% (rerata 31,9%). Pada tabel 4.2 dapat dilihat karakteristik dari subyek penelitian.

Pada tabel di atas terlihat sebaran karakteristik subyek penelitian, yang dikelompokkan dalam subyek penelitian dengan talasemia serta hemokromatosis dan kelompok kontrol. Terlihat pada subyek dengan hemokromatosis, lamanya mendapat transfusi serta median jumlah darah yang diberikan. Dilakukan perhitungan rasio antara jumlah darah yang ditransfusikan terhadap jarak lamanya transfusi dalam bulan. Dihitung juga rasio antara jumlah darah yang ditransfusikan terhadap berat badan subyek dalam satuan kilogram berat badan.

Pada kelompok penderita dengan hemokromatosis didapatkan rerata lama mendapat transfusi adalah 46,3 bulan dengan rentang 3,5 hingga 231,5 bulan. Median jumlah darah yang ditransfusikan adalah 32.063 mL dengan rentang 200 hingga 133.010 mL. Bila dihitung, rata-rata penderita mendapat 290,8 mL darah setiap bulannya, sedangkan bila dihitung rasio antara jumlah darah yang ditransfusikan terhadap berat badan maka didapatkan penambahan sejumlah rerata 686,8 mL darah per kilogram berat badan.

Dari perhitungan status gizi pada kelompok talasemia dengan hemokromatosis didapatkan 52,8% (57/108) mempunyai tinggi badan kurang (z score $< -2,0$), 34,3%

(37/100) dengan berat badan kurang dan 5,0% (6/100) mengalami kekurangan gizi (*malnourish*). Pada kelompok kontrol didapatkan 21,9% (24/100) mempunyai tinggi badan kurang, 13,1% (13/100) berat badannya kurang dan 4,7% (4/86) mengalami kekurangan gizi. Dari perbandingan BMI antara kelompok dengan hemokromatosis dan tanpa hemokromatosis terdapat perbedaan BMI yang berbeda bermakna ($p=0,000$).

4.2. PEMERIKSAAN PARAMETER LABORATORIUM LAIN

Pada tabel 4.3, terlihat perbandingan beberapa parameter laboratorium antara kelompok hemokromatosis dan kelompok kontrol. Untuk pemeriksaan fungsi hati yang meliputi parameter SGOT, SGPT dan albumin didapatkan adanya perbedaan yang bermakna antara kedua kelompok. Pada kelompok talasemia dengan hemokromatosis didapatkan berturut-turut 11 (10,2 %) dan 8 (7,4%) subjek dengan nilai SGOT dan SGPT lebih dari 3 kali nilai normal. Tidak didapatkan nilai SGOT dan SGPT yang meningkat lebih dari 3 kali pada kelompok kontrol. Untuk pemeriksaan albumin didapatkan 1 (0,9%) subjek pada kelompok talasemia dengan hemokromatosis mempunyai nilai albumin di bawah nilai batas bawah rujukan 3,5 g/dL. Tidak didapatkan nilai albumin yang berada di bawah nilai rujukan pada kelompok kontrol.⁹⁰

Tabel 4.3. Hasil pemeriksaan laboratorium lain

Parameter	Penderita Hemokromatosis (n=100)		p	Kontrol tanpa hemokromatosis (n=86)	
	Rerata	Rentang nilai		Rerata/Median*	Rentang nilai
SGOT (IU/L)	55,4	23,0 - 76,0	0,000	23,6	10,0 - 58,8
SGPT (IU/L)	19,9	23,7 - 44,7	0,000	13,51	3,1 - 54,8
Albumin (g/dl)	4,3	3,3 - 5,0	0,000	4,5	3,7 - 5,2
Ureum (mg/dL)	30,3	8,7 - 34,3	0,367	19,5	7,0 - 39,9
Kreatinin (mg/dL)	0,3*	0,1 - 0,5	0,008	0,4*	0,1 - 1,1
Gula darah (mg/dL)	108,1	67,4 - 201,5	0,01	107,3	51,7 - 227,8
H (mg/dL)	149,9	91,8 - 218,7	0,000	77,4	12,2 - 144,8
TIBC (mg/dL)	151	97,2 - 227,8	0,000	137,9	12,5 - 271,3

* Nilai rerata median

Terdapat perbedaan yang bermakna untuk parameter SGOT, SGPT, albumin, kreatinin, gula darah, SI (besi serum) dan TIBC (daya ikat total besi serum) antara kelompok penderita dan kontrol ($p < 0,05$).

Untuk tes fungsi ginjal antara kelompok hemokromatosis dan kelompok kontrol didapatkan adanya perbedaan bermakna hanya untuk parameter kreatinin saja, untuk umum tidak dijumpai adanya perbedaan yang bermakna. Untuk pemeriksaan fungsi ginjal hasil pemeriksaan umum dan kreatinin untuk kelompok penderita talasemia dengan hemokromatosis dan kelompok kontrol tidak didapatkan nilai yang berada di luar rentang nilai rujukan.⁴¹ Pada pemeriksaan glukosa didapatkan nilai rata-rata untuk kelompok talasemia dengan hemokromatosis secara bermakna sedikit lebih tinggi dibandingkan dengan kelompok kontrol. Terdapat 4 (3,7%) subyek talasemia dengan hemokromatosis dan 4 subyek (4,7%) kelompok kontrol yang mempunyai kadar glukosa sewaktu > 180 mg/dL. Terdapat 2 subyek dari kelompok hemokromatosis yang menggunakan insulin, tidak ada yang menggunakan obat anti diabetes oral. Pada kelompok kontrol tidak terdapat subyek yang mendapat terapi obat anti diabetes. Perhitungan besi serum (SI) dan daya ikat besi total (TIBC) digunakan untuk mendapatkan nilai saturasi transferin.

4.3. PENETAPAN KADAR ELASTASE 1 PANKREAS DALAM TINJA (E-1)

4.3.1. Pemeriksaan pendahuluan untuk E1

Pada penelitian pendahuluan pada 21 sampel dari kelompok kontrol tanpa kelebihan besi didapatkan adanya 19% (proporsi 0,2) subyek mempunyai nilai E1 yang rendah, < 200 mg/g. Sehingga untuk perhitungan estimasi besar sampel didapatkan nilai n adalah 65 orang untuk masing-masing kelompok (lihat tabel 4.3, lampiran 4).

4.3. Penetapan nilai elastase 1 pankreas (E1)

Penetapan elastase 1 pankreas tinja merupakan salah satu pemeriksaan untuk menilai fungsi eksokrin pankreas, dilakukan menggunakan metoda mikrodial. Pada tabel 4.4 dapat dilihat perbandingan antara kelompok penderita talasemia dengan hemokromatosis dan kelompok kontrol tanpa hemokromatosis. Didapatkan nilai rerata elastase yang lebih rendah secara bermakna pada kelompok hemokromatosis dibandingkan dengan kelompok kontrol tanpa hemokromatosis ($p < 0,05$).

Tabel 4.4. Hasil elastase 1 pankreas dalam tinja

E-1 pankreas	n	Rerata (mg/g)	Rentang nilai (mg/g)	p
Talasemia dengan hemokromatosis	108	157,4	11,9 - 485,0	p = 0,000*
Kontrol tanpa hemokromatosis	86	328,8	66,5 - 528,4	

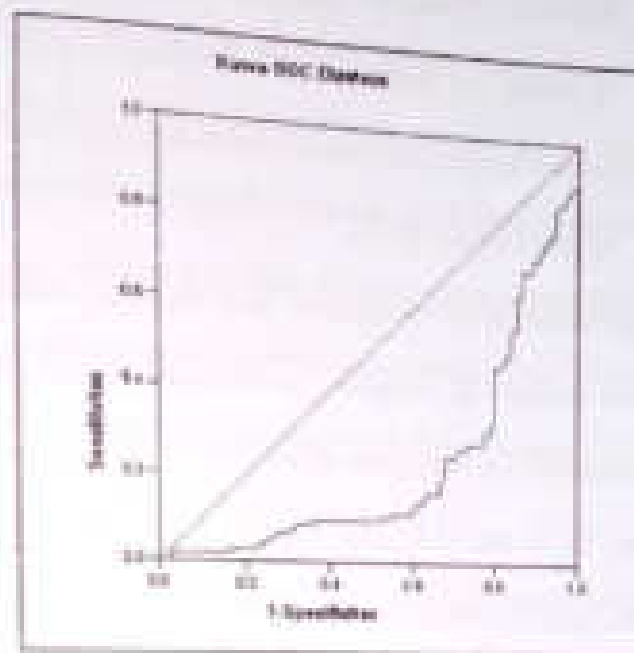
* berbeda bermakna secara statistik ($p < 0,05$)

Pada tabel ini terlihat perbedaan yang bermakna antara rerata E1 pada penderita talasemia dengan hemokromatosis dan tanpa hemokromatosis ($p < 0,05$).

Pada kelompok talasemia dengan hemokromatosis didapatkan proporsi E1 rendah pada 55,9% subjek, sedangkan pada kelompok kontrol didapatkan proporsi sebesar 14,7%.

Untuk mengetahui penggunaan pemeriksaan elastase-1 pankreas (E1) sebagai prediktor adanya gangguan fungsi pankreas, dilakukan penghitungan sensitivitas dan spesifitas pada berbagai cut off point berdasarkan kurva ROC untuk E-1. Pada batas nilai rujukan yang digunakan sebesar 200 mg/g, didapatkan nilai

sensitivitas 49% dan spesifisitas 17,3%, area under the curve 0,226. Jika digambarkan pada receiver operating characteristic (ROC) akan terlihat sebagai kurva pada gambar 4.1. Pemeriksaan elastase, khususnya pada nilai batas 200 ng/g ternyata sensitivitas dan spesifisitas yang didapat rendah dengan kemungkinan mendapatkan nilai tersebut hanya 22,6% saja.



Gambar 4.1. Kurva ROC untuk elastase

4.4. PENETAPAN KADAR LAKTOSA LAKTULOZA URIN UNTUK PERHITUNGAN AKTIVITAS LAKTASE

4.4.1. Validasi pemeriksaan laktosa laktulosa

Penetapan kadar laktosa laktulosa urin dilakukan dengan sistem kromatografi metoda KCKT. Diukur hasil absorpsi laktosa dan laktulosa di urin yang dikeluarkan melalui urin. Aktivitas laktase dinyatakan dalam rasio laktosa laktulosa dalam urin. Dihitung pula rasio antara asupan (g) dan ekskresi (ug/mL) laktosa serta laktulosa. Sebelum analisis dilakukan pada subyek penelitian dilakukan validasi metoda pemeriksaan dengan KCKT (lihat tabel 4.5, gambar 1 - 4 pada lampiran 3).

Digunakan alat *Prominence Liquid Chromatograph - LC-20AD* (Shimadzu) yang dilengkapi dengan degasser *DGU-20A₁*, autosampler *SIL-20A* dan *Column Oven CTO-10A5* (Shimadzu). Untuk detektor digunakan *Refractive Index Detector (RID)*, Shimadzu *RID-10A*. Kolom yang digunakan adalah kolom *Carbohydrate* analisa: 3.9×300 mm, $10 \mu\text{m}$ (Waters). Sistem integrasi data menggunakan perangkat lunak *LC Solution* Shimadzu. Digunakan detektor RID dengan temperatur sel 50°C , polaritas (+) dengan *auxiliary range* 1×10^4 RIU/Volt. Sebagai fase gerak digunakan larutan asetonitril/ akuaobisulfitat (80/20) dengan laju alir $1,3$ mL/menit, volume sampel $50 \mu\text{L}$.

Dilakukan pemeriksaan untuk mengetahui nilai stabilitas larutan standar, uji limit kuantitasi dan deteksi, uji linearitas, perhitungan akurasi dan presisi, perhitungan perolehan kembali (*recovery*) dan uji selektivitas. Nilai stabilitas pada suhu kamar hingga jam ke 24 dan pada suhu lemari es hingga hari ke 8 masih dalam batas-batas nilai yang diperbolehkan ($\delta < 2\%$). Untuk perhitungan SN laktosa dan laktulosa didapatkan nilai antara $7,16 - 10,53$ dan $9,79 - 15,51$. Limit deteksi dalam urin untuk laktosa dan laktulosa yang didapat adalah $250 \mu\text{g/mL}$. Dari kurva kalibrasi laktosa dan laktulosa urin didapatkan persamaan garis untuk laktosa $Y = 516,53x - 30933$ ($r = 0,9957$) dan untuk laktulosa $Y = 1639,5 - 15203$ ($r = 0,9835$). Presisi untuk laktosa laktulosa dalam urin masih dalam batas yang diperbolehkan yaitu nilai koefisien variasi $9,04\%$ dan $10,17\%$ pada lima replikasi penyuntikan. Akurasi memenuhi persyaratan dengan rentang δ perbedaan (δ) $-9,34$ hingga $12,20\%$ untuk laktosa dan antara $-11,99$ hingga $10,98\%$ untuk laktulosa. Perolehan kembali (*recovery*) ditunjukkan dengan persentase perolehan kembali dari laktosa dan laktulosa urin 250 ppm yakni untuk laktosa dalam rentang $90,66$

hingga 112,20% dan untuk laktulosa berada dalam rentang 88,01 hingga 107,69%. Pada uji selektivitas diamati bahwa tak dapat digunakan baku dalam karbohidrat lain karena waktu retensi berhimpit dengan unsur lain yang terlewat dalam urin.

4.4.2. Penentuan nilai rujukan untuk laktase

Hasil penelitian pendahuluan pada 20 subjek sehat didapatkan rentang nilai ekskresi urinik laktosa dan laktulosa berturut-turut sebesar 0-75,9 $\mu\text{g/mL}$ (rerata 19,5 $\mu\text{g/mL}$, median 0 $\mu\text{g/mL}$) dan 0-82,0 $\mu\text{g/mL}$ (rerata 17,0 $\mu\text{g/mL}$, median 0 $\mu\text{g/mL}$). Aktivitas laktase yang dihitung dari ratio laktosa laktulosa didapatkan rentang 0-7,5 (rerata 0,7, median 1,1). Bila dihitung ratio antara asupan laktosa (g) dan laktulosa (g) terhadap masing-masing ekskresinya ($\mu\text{g/mL}$) didapatkan ratio untuk laktosa dan laktulosa sebesar berturut-turut 0-4,6 (rerata 1,2, median 0) dan 0-5,0 (rerata 1,0, median 0) (lihat tabel 2, lampiran 4).

Laktosa dan laktulosa ($\mu\text{g/mL}$) adalah besarnya masing-masing laktosa dan laktulosa yang diabsorpsi di usus dan diekskresikan melalui urin. Ratio laktosa dan laktulosa menggambarkan aktivitas laktase di usus. Ratio ekskresi/ asupan laktosa atau laktulosa adalah ratio antara laktosa dan laktulosa yang keluar melalui urin dibandingkan dengan jumlah asupan yang diberikan. Untuk batasan nilai rujukan yang digunakan untuk menghitung progresi kelainan pada penderita talasemia adalah ratio laktosa laktulosa (laktase) 1,1.

4.4.3. Penentuan proporsi kelainan laktase dan estimasi besar target pada kelompok kontrol

Pemeriksaan pendahuluan dilakukan pada 15 subjek dengan talasemia target hemokromatosis (lihat tabel 3 dan 4, lampiran 4) untuk menghitung estimasi besar

sampel. Batas rujukan dari kontrol sehat yang digunakan untuk menentukan proporsi banyaknya laktase abnormal adalah 1,1 (median). Didapatkan proporsi laktase abnormal pada 9/15 (0,6) subyek talasemia tanpa hemokromatosis, sehingga dari perhitungan estimasi besar sampel yang diperlukan adalah 60 orang untuk masing-masing kelompok.

4.4.4 Hasil perhitungan aktivitas laktase

Pada tabel 4.5. dapat dilihat perbandingan antara nilai median laktosa dan laktulosa di urin serta aktivitas laktase antara kelompok talasemia dengan hemokromatosis dengan kelompok kontrol tanpa hemokromatosis. Meskipun dijumpai adanya perbedaan pada median antara kedua kelompok, tetapi tidak dijumpai perbedaan bermakna kecuali pada ekskresi laktulosa di urin ($p < 0,05$). Ekskresi laktosa menggambarkan jumlah sisa laktosa dari pembebanan yang tidak dicerna di usus, masuk melalui jalur paracelular enterosit dan dapat diukur kadarnya di urin. Semakin banyak laktosa yang dijumpai di urin semakin kecil aktivitas enzim laktase usus. Rasio antara laktosa/laktulosa menggambarkan aktivitas laktase usus. Semakin tinggi rasio dianggap semakin rendah aktivitas laktase. Dibitung pula rasio perbandingan antara jumlah laktosa dan laktulosa yang diabsorpsi terhadap masing-masing jumlah asupan laktosa dan laktulosa yang diberikan. Perhitungan ini dilakukan karena terdapat perbedaan berat badan yang merupakan dasar perhitungan laktosa dan laktulosa yang diberikan sebagai pembebanan. Sekresi laktulosa di urin merupakan petanda integritas enterosit di usus halus. Semakin baik integritas *gap junction* enterosit semakin rendah jumlah laktulosa yang dijumpai di urin.

Pada kelompok talasemia dengan hemokromatosis didapatkan nilai median yang sedikit lebih tinggi, tetapi tidak berbeda bermakna secara statistik ($p > 0,05$). Bila dibandingkan, maka kelompok talasemia dengan hemokromatosis mempunyai aktivitas laktase yang sedikit lebih rendah dibandingkan kelompok kontrol tanpa hemokromatosis, meskipun perbedaan ini tidak bermakna. Perbedaan pada ekskresi laktulosa menggambarkan adanya perbedaan pada integritas *tight junctions* enterosit.

Pada kelompok dengan hemokromatosis didapatkan proporsi laktase yang abnormal pada 12,2% subjek, sedangkan pada kelompok kontrol didapatkan proporsi abnormal sebesar 10%. Perbedaan ini tidak bermakna secara statistik ($p > 0,05$).

Tabel 4.5. Hasil analisis aktivitas laktase

Parameter	Talasemia dengan hemokromatosis n=56		Kelompok kontrol tanpa hemokromatosis n=60		P
	Median	Rentang	Median	Rentang	
Laktosa (ug/mL)	47,0	0 - 681,7	66,4	0 - 1857,10	0,669
Laktulosa (ug/mL)	29,6	0 - 442,4	73,9	0 - 1466,25	0,028
Aktivitas laktase	1,23	0 - 30,91	1,0	0 - 9,50	0,200
Rasio asupan laktosa (ug/mL)	2,68	0 - 10,65	2,59	0 - 10,49	0,199
Rasio asupan laktulosa (ug/mL)	3,38	0 - 103,91	6,11	0 - 103,46	0,746

Terdapat perbedaan bermakna ($p < 0,05$) hanya antara parameter laktulosa antara kelompok talasemia dengan hemokromatosis dengan kelompok kontrol tanpa hemokromatosis.

Tabel 4.6. Perbandingan aktivitas laktase subyek sehat, talasemia dengan hemokromatosis dan kelompok kontrol tanpa hemokromatosis

	Kelompok	Laktosa ($\mu\text{g/mL}$)	Laktulosa ($\mu\text{g/mL}$)	Laktase (ratio)	Rasio laktosa	Rasio Laktulosa
Kolmogorov-Smirnov Z	1-2	2,530	1,897	2,055	2,530	1,897
Asymp. Sig. (2-tailed)		0,000	0,001	0,000	0,000	0,001
Kolmogorov-Smirnov Z	1-3	2,688	2,055	1,739	2,688	2,055
Asymp. Sig. (2-tailed)		0,000	0,000	0,005	0,000	0,000
Kolmogorov-Smirnov Z	2-3	0,474	1,265	0,791	0,632	1,423
Asymp. Sig. (2-tailed)		0,978	0,082	0,560	0,819	0,035

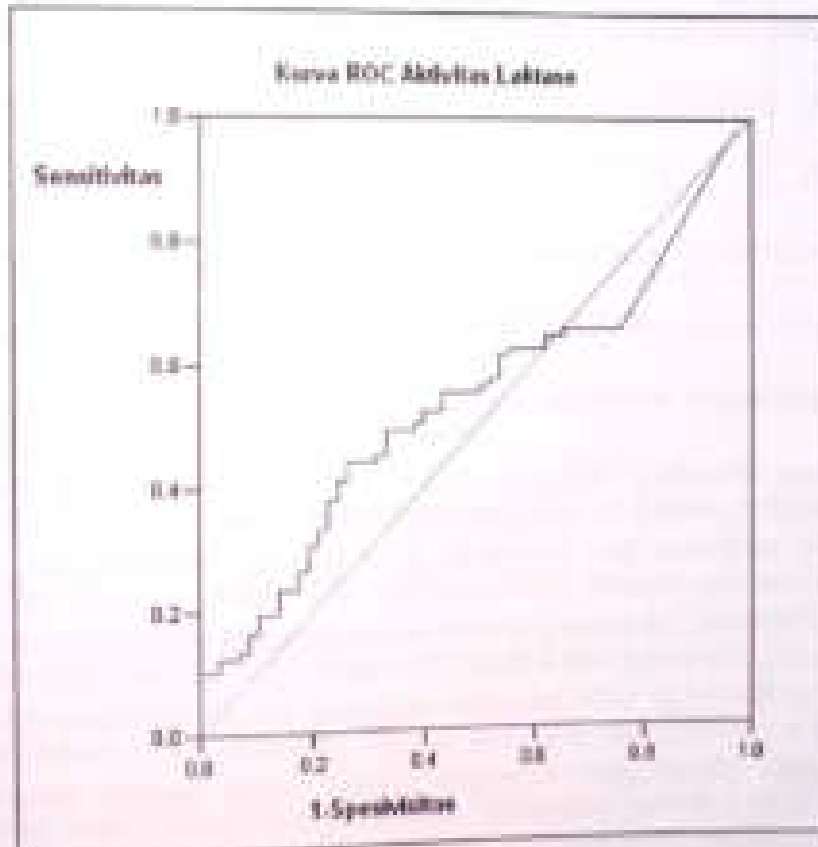
Kelompok 1= subyek sehat, 2= subyek talasemia dengan hemokromatosis, 3= subyek talasemia tanpa hemokromatosis (n = 20 anak masing-masing kelompok).

Terdapat perbedaan yang bermakna aktivitas laktase pada kelompok sehat dibandingkan kelompok talasemia dengan hemokromatosis maupun talasemia tanpa hemokromatosis.

Pada penelitian sebelumnya dilakukan pemeriksaan aktivitas laktase pada 20 subyek sehat. Dilakukan perbandingan untuk parameter laktosa dan laktulosa di urin, laktase serta rasio laktosa dan laktase pada 3 kelompok, yaitu antara kelompok subyek sehat, kelompok talasemia dengan hemokromatosis dan kelompok kontrol tanpa hemokromatosis. Diambil masing-masing 20 subyek sehat, 20 subyek talasemia dengan hemokromatosis dan 20 subyek tanpa hemokromatosis (tabel 4.6). Perhitungan awal dilakukan dengan uji statistik Kruskal Wallis. Terdapat perbedaan bermakna untuk laktosa, laktulosa dan aktivitas laktase. Demikian pula untuk terdapat perbedaan bermakna pada rasio laktosa serta rasio laktulosa ($p < 0,050$). Dilakukan uji statistik Man-Whitney antara masing-masing 2 kelompok, yaitu kelompok subyek sehat dengan hemokromatosis dan tanpa hemokromatosis serta antara kelompok talasemia dengan dan tanpa hemokromatosis untuk melihat perbedaan antar kelompok.

Dijumpai adanya perbedaan yang bermakna antara kelompok subjek sehat terhadap kelompok talasemia baik dengan atau tanpa hemokromatosis ($p < 0,05$), tetapi tak dijumpai adanya perbedaan yang bermakna antara kelompok talasemia dengan hemokromatosis dan tanpa hemokromatosis ($p > 0,05$).

Untuk mengetahui penggunaan pemeriksaan aktivitas laktase sebagai prediktor adanya gangguan enzim usus halus, dilakukan penghitungan sensitivitas dan spesifisitas pada berbagai *cut off point* berdasarkan kurva ROC untuk laktase. Pada batas nilai rujukan yang digunakan rasio sebesar 1,1 didapatkan nilai sensitivitas 63,2 % dan spesifisitas 37,9 %, area under the curve 0,542. Sedangkan bila digunakan batas rasio 2,11 didapatkan nilai sensitivitas dan spesifisitas 0,551 dan 0,568. Jika digambarkan pada *receiver operating characteristic* (ROC) akan terlihat sebagai kurva pada gambar 4.2.



Gambar 4.2. Kurva ROC aktivitas laktase

4.5. PENETAPAN HEPSIDIN DAN PARAMETER BESI TUBUH LAIN

4.5.1. Penetapan hepsidin serum

Pemeriksaan hepsidin serum dilakukan dengan metoda mikroselisa. Pada tabel 4.7, dapat dilihat perbandingan antara kadar hepsidin, nilai saturasi transferrin, ferritin, NTBI dan ratio hepsidin/ferritin antara kedua kelompok.

Tabel 4.7. Profil kadar hepsidin dan parameter besi lain

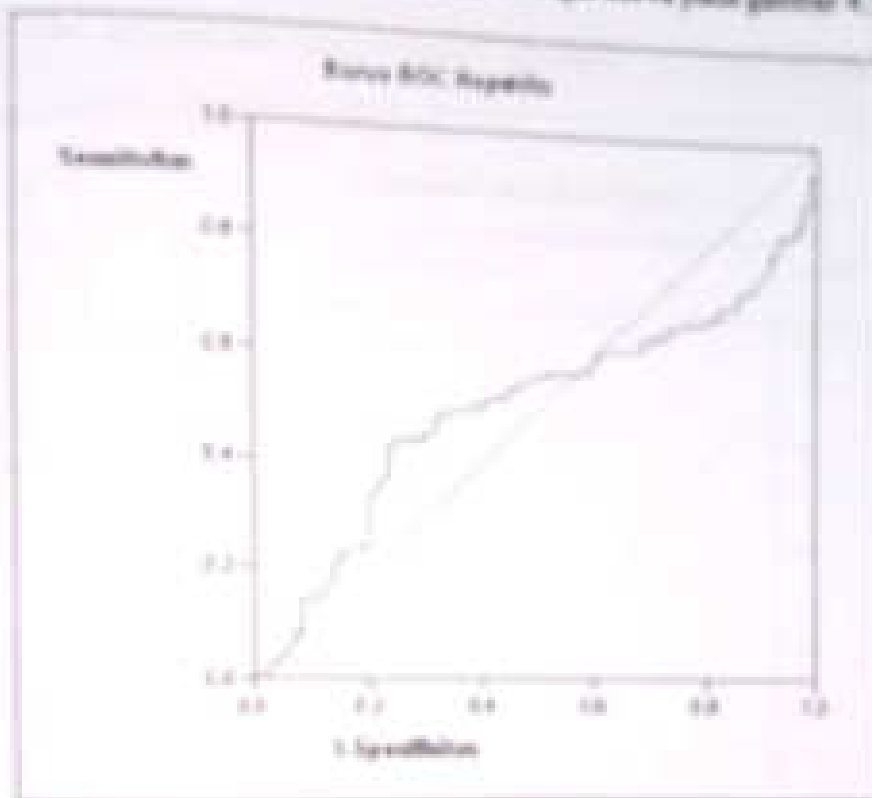
Parameter	Talasemia dan hemokromatosis		Kelompok kontrol tanpa hemokromatosis		p
	Rerata	Rentang	Rerata	Rentang	
Hepsidin (ng/mL)	418,7*	49,8 – 983,4	257,3*	87,3 – 920,2	0,900
Saturasi transferrin (%)	68,7	58,6 – 100,4	31,9	5,8 – 53,9	0,000
Ferritin (ng/mL)	4716,4	77,0 – 14.381,8	103,9	3,9 – 5654,7	0,000
NTBI (μ L/mL)	4,66	1,40 – 6,50	1,05	0 – 2,97	0,000
Ratio hepsidin/ferritin	0,08	0,008 – 8,01	1,80	0,017 – 43,3	0,000

* sebagai nilai median.

Terdapat perbedaan bermakna ($p < 0,05$) untuk parameter saturasi transferrin, ferritin, NTBI dan ratio hepsidin/ferritin antara kelompok talasemia dengan dan tanpa hemokromatosis.

Pada penelitian ini ekspresi hepsidin dinilai sebagai kadar hepsidin serum dan sebagai ratio antara hepsidin terhadap ferritin. Untuk perbandingan kadar hepsidin meskipun tampak median kadar hepsidin pada kelompok hemokromatosis jauh lebih tinggi dibanding kelompok kontrol, tetapi secara statistik tidak dijumpai adanya perbedaan yang bermakna antara kelompok talasemia dengan hemokromatosis terhadap kelompok talasemia dengan hemokromatosis ($p > 0,05$). Rerata ratio hepsidin/ferritin pada kelompok talasemia dengan hemokromatosis jauh lebih rendah dibandingkan kelompok kontrol. Nilai tersebut berbeda bermakna secara statistik ($p = 0,000$).

Untuk mengetahui penggunaan pemeriksaan kapada sebagai prediktor dalam program kesehatan besi tubuh, dilakukan penghitungan sensitivitas dan spesifitas pada berbagai cut off point berdasarkan kurva ROC untuk kapada pada batas nilai 258,2 ug/dl, didapatkan nilai sensitivitas 55,52 % dan spesifitas 51,17%, dengan area under the curve 0,505. Hal diambarkan pada receiver operating charactertic (ROC) dan terlihat sebagai kurva pada gambar 4.3

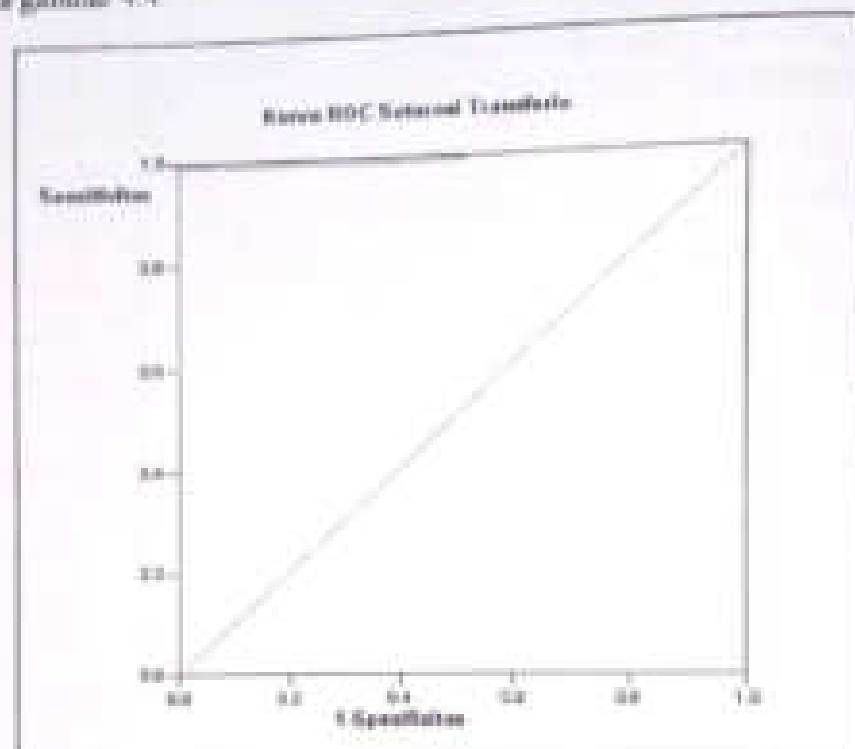


Gambar 4.3. Kurva ROC kapada

4.2. Penetapan standar transferis serum

Pemeriksaan standar transferis merupakan percentasi besi serum dan kemampuan daya ikat besi total tubuh. Pemeriksaan besi serum dan daya ikat besi total dilakukan dengan alat analisis kimia otomatis menggunakan metode Ferron. Untuk parameter standar besi yang menggambarkan besarnya besi yang terikat protein dalam sirkulasi, didapatkan rata-rata pada kelompok normalisasi dan kali lebih tinggi dibanding kelompok kontrol ($p < 0,05$)

Untuk mengetahui penggunaan pemeriksaan saturasi transferin sebagai penanda adanya kelebihan besi, dilakukan penghitungan sensitivitas dan spesifitas pada berbagai *cut-off point* berdasarkan kurva ROC untuk saturasi transferin. Pada batas nilai rujukan yang digunakan saturasi 55%, didapatkan nilai sensitivitas 99,1 % dan spesifitas 89,4 %, *area under the curve* 0,995. Jika digambarkan pada *receiver operating characteristic* (ROC) akan terlihat sebagai kurva pada gambar 4.4.



Gambar 4.4. Kurva ROC Saturasi transferin

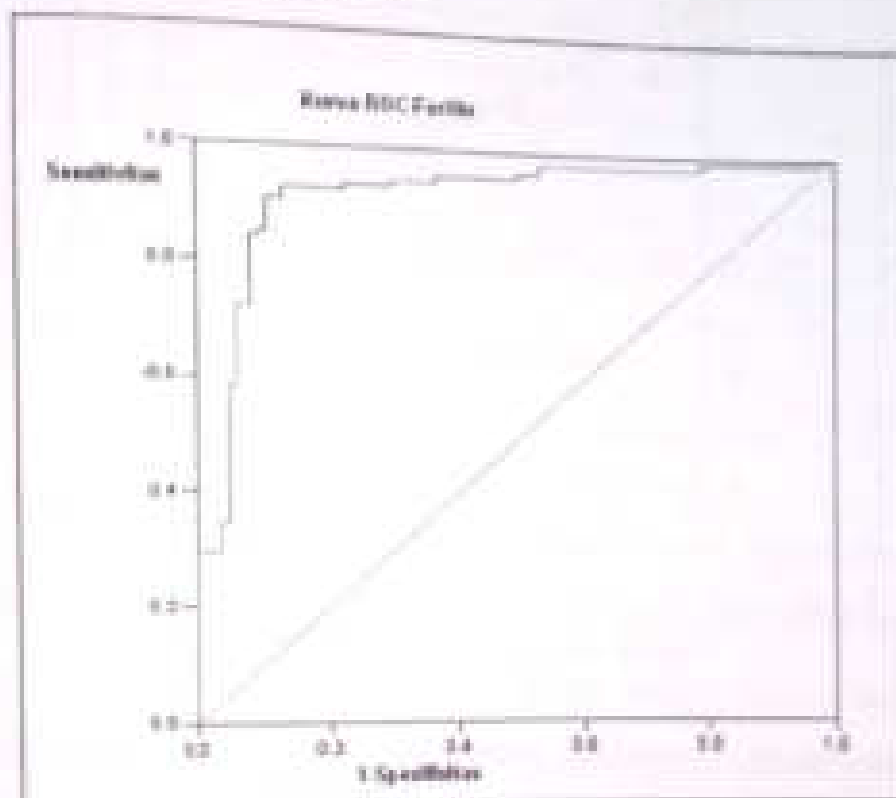
4.5.3. Penetapan ferritin serum

Pemeriksaan ferritin dilakukan dengan alat Elecsys secara otomatis menggunakan metoda *chemoluminescent*. Pemeriksaan ferritin serum menggambarkan besarnya cadangan besi tubuh.

Dari hasil pemeriksaan pada kelompok penderita talasemia dengan hemokromatosis didapatkan rerata ferritin nilainya sangat meningkat, lebih dari 40 kali

lipat dibanding kelompok kontrol. Nilai tersebut secara statistik berbeda bermakna ($p < 0,05$)

Untuk mengetahui penggunaan pemeriksaan ferritin sebagai petanda adanya kelebihan besi, dilakukan penghitungan sensitivitas dan spesifisitas pada berbagai *cut off point* berdasarkan kurva ROC untuk ferritin. Pada nilai ferritin 1145 ng/mL, didapatkan nilai sensitivitas 91,0 % dan spesifisitas 89,4 %, *area under the curve* 0,921. Jika digambarkan pada *receiver operating characteristic* (ROC) akan terlihat sebagai kurva pada gambar 4.5

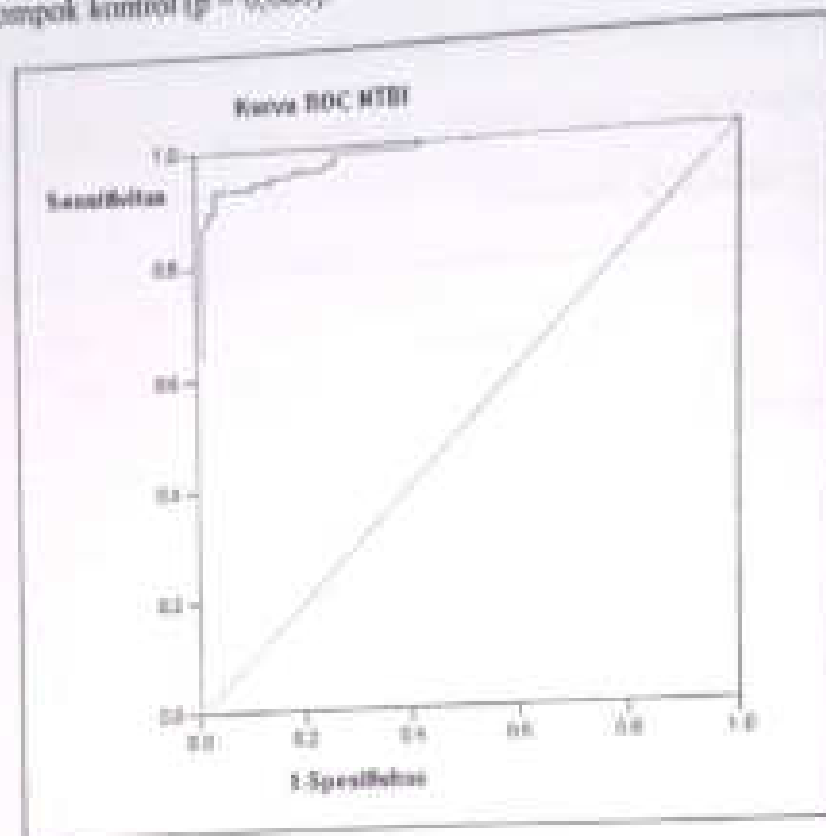


Gambar 4.5. Kurva ROC Ferritin

4.5.4. Penetapan NTBI serum

Pemeriksaan NTBI serum merupakan pemeriksaan mikroselia dengan menggunakan fluoresensi. Pemeriksaan dilakukan dengan alat Fluorostat di Eijkman Wrinkel, Utrecht. Dari hasil pemeriksaan pada kelompok penderita

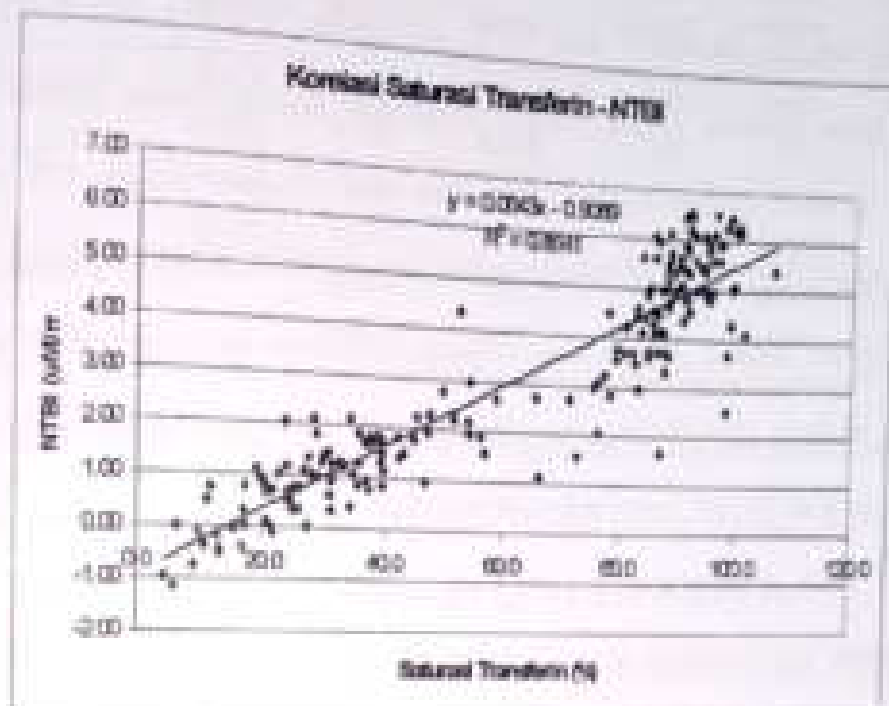
talasemia dengan hemokromatosis didapatkan nilai rerata NTBI 4,66 $\mu\text{U/ml}$, dengan rentang nilai antara 1,65-6,50 $\mu\text{U/ml}$. Pada kelompok kontrol didapatkan nilai rerata NTBI 1,03 $\mu\text{U/ml}$, dengan rentang nilai 0 - 2,97 $\mu\text{U/ml}$. Nilai yang didapat pada kelompok talasemia dengan hemokromatosis berbeda bermakna dengan kelompok kontrol ($p = 0,000$).



Gambar 4.6. Kurva ROC NTBI

Untuk mengetahui penggunaan pemeriksaan NTBI sebagai petanda adanya kelebihan besi bebas di sirkulasi, dilakukan perhitungan sensitivitas dan spesifisitas pada berbagai *cut off point* berdasarkan kurva ROC untuk NTBI. Pada nilai NTBI 2,43 $\mu\text{U/ml}$, didapatkan nilai sensitivitas 93,2 % dan spesifisitas 96,4 %, *area under the curve* 0,980. Jika digambarkan pada *receiver operating characteristics* (ROC) akan terlihat sebagai kurva pada gambar 4.6.

Pada pemeriksaan NTBI serum yang menggambarkan banyaknya besi bebas yang beredar di sirkulasi, didapatkan rerata pada kelompok hemokromatosis nilainya 4 kali lebih tinggi dibanding kelompok kontrol tanpa hemokromatosis ($p < 0,05$).



Gambar 4.7. Korelasi saturasi transferin dan NTBI

Dilakukan perhitungan untuk mencari korelasi antara saturasi transferin dan NTBI serta mencari persamaan untuk dapat memprediksi nilai NTBI dari nilai saturasi transferin. Pada penelitian ini didapatkan korelasi saturasi transferin terhadap NTBI mempunyai $r = 0,9296$ ($p < 0,050$), dengan persamaan garis $y = 0,0643x - 0,9089$. Persamaan ini dapat digunakan untuk memprediksi banyaknya besi bebas NTBI yang ada di sirkulasi berdasarkan pemeriksaan saturasi transferin.

4.6. KORELASI ANTARA SATURASI TRANSFERIN DAN NTHI TERHADAP FUNGSI PENCERNAAN

4.6.1. Penghitungan ulang estimasi besar sampel

Pada perhitungan awal pada penelitian pendahuluan, korelasi antara elastase dengan saturasi transferin dan NTHI didapatkan r 0,233 dan 0,088. Pada perhitungan estimasi jumlah sampel didapatkan masing-masing jumlah sampel untuk korelasi antara saturasi transferin dan elastase adalah 128 subjek, sedangkan untuk korelasi antara elastase dan NTHI didapatkan jumlah sampel 787 subjek. Karena jumlah sampel yang diperlukan untuk penelitian korelasi antara elastase dan NTHI sangat besar maka dilakukan perhitungan ulang menggunakan seluruh data yang telah dianalisis.

Pada perhitungan korelasi pada seluruh subjek didapatkan r -0,477. Dilakukan penghitungan ulang estimasi jumlah sampel untuk korelasi antara elastase dan NTHI, dan didapatkan jumlah sampel yang diperlukan adalah 46 subjek. Dari pemeriksaan pendahuluan telah dilakukan penghitungan besar sampel untuk korelasi antara saturasi transferin dan NTHI terhadap laktase. Jumlah sampel yang diperlukan untuk uji korelasi antara saturasi transferin dan laktase adalah 25. Jumlah sampel yang diperlukan untuk uji korelasi antara NTHI dan laktase adalah 124. Jumlah sampel memenuhi syarat untuk dipergunakan.

4.6.2. Korelasi antara saturasi transferin dan NTHI terhadap fungsi pencernaan

Pada tabel 4.8 terlihat adanya korelasi sedang antara saturasi transferin terhadap elastase 1 paketas ($r = -0,478$, $p = 0,000$), dan antara NTHI dengan

elastase I pankreas ($r = -0,427$; $p = 0,000$). Hanya terdapat korelasi lemah antara ekskresi laktulosa dengan saturasi transferin ($r = 0,189$; $p = 0,018$).

Tabel 4.8. Korelasi antara parameter besi terhadap elastase dan laktase

Parameter	Elastase (mg/g)	Laktosa (ppm)	Laktulosa (ppm)	Laktase (ratio)	Rasio asupan laktosa	Rasio asupan laktulosa
Saturasi transferin	-0,478	-0,021	-0,189	0,002	0,043	-0,099
P	0,000	0,799	0,018	0,980	0,593	0,217
NTBI	-0,427	-0,043	-0,124	-0,013	0,024	-0,032
P	0,000	0,597	0,124	0,872	0,768	0,695
Saturasi transferin*		0,288	0,007	0,286	0,275	0,071
P		0,026	0,613	0,027	0,034	0,589

* Bila dihitung korelasi dari kelompok subjek normal-talasemia dengan dan tanpa hemokromatosis ($n=60$)

Tidak dijumpai adanya korelasi yang bermakna antara aktivitas laktase dengan saturasi transferin dan NTBI. Bila dihitung korelasi antara kelompok subjek normal, talasemia dengan hemokromatosis dan kontrol tanpa hemokromatosis ($n=60$) maka terdapat korelasi lemah antara saturasi transferin dengan aktivitas laktase ($p < 0,05$).

4.6.3. Korelasi antara ekspresi hepsidin terhadap fungsi pencernaan

Pada tabel di bawah ini terlihat adanya korelasi sedang antara rasio hepsidin/ ferritin dengan elastase ($r = 0,412$, $p = 0,000$) dan terdapat korelasi lemah antara rasio hepsidin/ ferritin dengan laktulosa urin ($r = 0,227$, $p = 0,004$).

Tabel 4.9. Korelasi ekspresi hepsidin terhadap fungsi pencernaan

	Elastase	Laktulosa urin
Rasio hepsidin/ferritin	$r=0,412$	$r=0,227$
	$p=0,000$	$p=0,004$

4.7. KORELASI HEPSIDIN DENGAN STATUS BESI TUBUH DAN ERITROPOIESIS

Pada tabel 4.10 dapat dilihat korelasi hepsidin dengan berbagai parameter yang menggambarkan status besi tubuh yaitu besi yang terikat protein (besi serum dan saturasi transferin) dan besi bebas dalam sirkulasi. Juga dihitung korelasinya terhadap parameter yang menggambarkan aktivitas eritropoiesis, yaitu retikulosit, *Immature Reticulocyte Fraction* (IRF, fraksi retikulosit imatur) dan *High Fluorescence Reticulocyte* (HFR, fraksi retikulosit termuda dalam sirkulasi). Dapat terlihat adanya korelasi negatif yang bermakna antara rasio hepsidin/ferritin dengan besi serum, saturasi transferin dan NTBI. Semakin tinggi hepsidin, semakin rendah besi serum, saturasi transferin serta NTBI.

Tabel 4.10. Hubungan hepsidin dengan status besi tubuh dan eritropoiesis

Korelasi (r)	Besi serum	Saturasi transferin	NTBI	Ri	IRF	HFR
Rasio Hepsidin/ferritin	-0,659	-0,741	-0,691	-0,156	-0,279	-0,336
P	0,000	0,000	0,000	0,003	0,000	0,000

Ri = retikulosit, IRF = *immature reticulocyte fraction*, HFR = *high fluorescence reticulocyte*.

Tampak pula korelasi negatif hepsidin dengan retikulosit (Ri) matang, fraksi retikulosit muda (IRF) serta fraksi retikulosit yang sangat muda (HFR) yang masih mengandung sisa RNA dan DNA dalam sitoplasmanya. Fraksi HFR menggambarkan fraksi retikulosit yang lebih banyak mengandung sisa RNA. Semakin tinggi aktivitas eritropoiesis semakin rendah rasio hepsidin/ferritin.

4.8. MODEL UNTUK PREDIKSI EKSPRESI HEPSIDIN

Ekspresi hepsidin yang dihitung sebagai rasio hepsidin/feritin dipengaruhi oleh beberapa faktor lain sesuai dengan model sebagai berikut :

$$\text{Log hepsidin/feritin} = -1,126 - 0,095 \text{ Hb} - 0,007 \text{ Si} + 0,009 \text{ TIBC} + 0,785 \log \text{CC/BB} - 0,368 \log \text{CC/Blm} - 0,065 \text{ NTBI}$$

Nilai R^2 yang diperoleh adalah 0,539 ($p = 0,000$).

Hb = kadar hemoglobin

Si = besi serum

TIBC = daya ikat besi total

CC/BB = rasio jumlah darah/berat badan

CC/Blm = jumlah darah/ lama transfusi

Model dengan persamaan ini didapat dengan menggunakan perhitungan regresi linier dengan metode *enter*. Dari persamaan model di atas, tampak bahwa ekspresi hepsidin yang dinyatakan dalam rasio hepsidin/feritin dipengaruhi terutama oleh kadar hemoglobin, Si, TIBC, rasio jumlah darah yang ditransfusikan/ berat badan, rasio jumlah darah yang diberikan/bulan serta NTBI. Dengan menggunakan model persamaan di atas dapat diterangkan variasi rasio hepsidin/feritin sebesar 53,9%, sisanya diterangkan dengan faktor lain yang tak termasuk dalam model.

4.9. HUBUNGAN HEPSIDIN DENGAN INFEKSI

Pada tabel 4.11, dapat dilihat korelasi antara hepsidin dengan jumlah relatif neutrofil sebagai petanda adanya infeksi bakterial. Terdapat adanya korelasi positif lemah antara jumlah relatif neutrofil dengan rasio hepsidin/feritin ($p < 0,050$). Semakin tinggi neutrofil, semakin meningkat rasio hepsidin/feritin. Terdapat pula korelasi negatif antara hepsidin/feritin ($p < 0,050$) dengan limfosit. Semakin rendah limfosit semakin meningkat rasio hepsidin/feritin.

Tabel 4.11. Hubungan hepsidin dengan neutrofil

Korelasi	Neutrofil (%)	Limfosit (%)
Rasio	$r = 0,278$	$r = -0,324$
Hepsidin/feritin	$(p=0,000)$	$(p=0,000)$

4.10. KORELASI ANTARA BESI TUBUH DENGAN TRANSFUSI DARAH

Pada tabel 4.12. dapat dilihat korelasi antara jumlah darah yang diberikan kepada penderita talasemia mayor, rasio jumlah darah dibandingkan waktu lamanya telah mendapat transfusi serta rasio pembebanan darah transfusi per kilogram berat badan penderita terhadap beberapa parameter besi tubuh.

Tabel 4.12. Korelasi antara parameter besi dengan transfusi darah

Korelasi	Jumlah transfusi (ml)	Rasio jumlah darah/lama transfusi	Rasio jumlah darah/berat badan
Saturasi transferin	$r = 0,503$ $(p=0,000)$	$r = 0,113$ $(p=0,239)$	$r = 0,463$ $(p=0,000)$
Feritin	$r = 0,655$ $(p=0,000)$	$r = 0,192$ $(p=0,048)$	$r = 0,692$ $(p=0,000)$
Rasio Hepsidin/feritin	$r = -0,506$ $(p=0,000)$	$r = -0,484$ $(p=0,000)$	$r = 0,162$ $(p=0,298)$
NTBI	$r = 0,417$ $(p=0,000)$	$r = 0,342$ $(p=0,000)$	$r = 0,069$ $(p=0,490)$

Dijumpai adanya korelasi yang positif antara saturasi transferin, feritin dan NTBI terhadap banyaknya darah yang ditransfusikan serta banyaknya darah per kg berat badan yang diberikan. Semakin banyak jumlah darah yang ditransfusikan semakin tinggi nilai saturasi transferin, feritin dan NTBI. Dari persamaan :

$$\text{Saturasi transferrin (\%)} = 0,0001x \text{ jumlah darah yang diberikan (ml.)} + 84,407$$
$$\text{Feritin (ng/ml)} = 0,053x \text{ jumlah darah yang diberikan (ml.)} + 3576,6$$

Berdasarkan persamaan di atas dapat diprediksi kenaikan nilai saturasi transferrin dan feritin setelah sejumlah tertentu darah ditransfusikan.

Terdapat korelasi yang negatif antara rasio hepsidin/feritin dengan banyaknya darah yang diberikan dan rasio jumlah darah dengan lamanya transfusi. Semakin banyak darah yang diberikan, semakin rendah rasio hepsidin/feritin. Terdapat korelasi yang sedang antara NTBI terhadap jumlah darah yang diberikan serta rasio jumlah darah persatuan waktu.

BAB V

PEMBAHASAN

5.1. KARAKTERISTIK SUBYEK PENELITIAN

Pada penelitian ini terdapat sejumlah 108 penderita talasemia dengan hemokromatosis dan 86 penderita talasemia tanpa hemokromatosis sebagai kelompok kontrol yang menjadi subyek pada penelitian ini. Penderita talasemia mayor dengan hemokromatosis terdiri mempunyai rerata usia yang lebih muda dibanding subyek kontrol. Dijumpai adanya perbedaan yang bermakna antara kelompok penderita dengan hemokromatosis dan kelompok tanpa hemokromatosis untuk data karakteristik umur, tinggi serta berat badan. Perbedaan antara rerata usia kelompok penderita dibanding kelompok kontrol ini disebabkan karena ternyata anak dengan talasemia mayor meskipun usianya masih muda dan merupakan penderita baru tetap telah mempunyai nilai saturasi transferrin $> 55\%$, dan dianggap telah mengalami kelebihan besi sehingga tak dapat diambil sebagai kelompok kontrol. Terdapat kesulitan untuk mencari subyek untuk kelompok kontrol dengan karakteristik umur yang serupa maupun mencari penderita talasemia mayor yang belum mengalami kelebihan besi. Kelompok kontrol yang digunakan pada penelitian ini adalah saudara kandung penderita talasemia mayor atau orang tua kandungnya yang merupakan pembawa sifat (*trait*). Hal ini menyebabkan terjadinya perbedaan usia yang besar pada kedua kelompok tersebut. Hal ini juga menyebabkan terjadinya perbedaan pada berat badan dan tinggi badan di kedua kelompok tersebut.

Dari 194 subyek penelitian dan kontrol yang ikut dalam awal penelitian, terdapat beberapa subyek baik dari kelompok hemokromatosis maupun tanpa hemokromatosis yang tidak mengikuti pemeriksaan secara lengkap. Hal ini disebabkan karena pengumpulan bahan berupa darah, urin berkala dan tinja sewaktu tidak dilakukan pada satu hari yang sama sehingga beberapa subyek penelitian tidak memberikan sampel untuk tinja dan urin berkala secara lengkap sehingga tidak dapat dianalisis datanya untuk beberapa parameter tertentu.

Talasemia mayor adalah suatu kelainan bawaan yang menyebabkan penderitanya mengalami anemia berat dan memerlukan transfusi berulang. Banyaknya darah yang diberikan selama periode waktu tertentu akan berpengaruh pada peningkatan konsentrasi besi tubuh penderita yang cepat, selain akibat peningkatan absorpsi besi untuk mengimbangi aktivitas eritropoiesis yang sangat aktif.^{1,2} Umumnya penderita talasemia mayor akan mengalami gangguan pada proses tumbuh kembangnya yang juga dapat dilihat dari bentuk tubuhnya.^{2,4} Selain itu dilaporkan juga bahwa penderita talasemia mayor dengan transfusi berulang akan mengalami berbagai kelainan pada organ tubuhnya, termasuk pada sistem saluran cernanya.^{12,13} Pada anak penderita talasemia mayor, terutama yang telah menderita hemokromatosis, kelebihan besi sekunder dapat terjadi, baik akibat peningkatan absorpsi besi di usus maupun transfusi berulang yang diberikan. Gangguan pada berbagai sel tubuh akan timbul, termasuk gangguan pada saluran cerna yang dapat mengganggu pertumbuhan penderitanya. Hal ini diperkirakan terjadi pada penderita talasemia mayor yang dilaporkan mengalami gangguan pada tinggi badan maupun berat badan. Pada anak-anak tersebut,

meskipun telah diberikan nutrisi yang memadai, proses pertumbuhannya tetap tidak akan optimal karena berbagai faktor.²⁴

Pada penelitian ini dari perhitungan status gizi pada kelompok talasemia dengan hemokromatosis dijumpai lebih dari separuh penderitanya (52,8%) mempunyai tinggi badan kurang, sekitar sepertiga penderita (34,3%) mempunyai berat badan kurang dan 5,6% mengalami kekurangan gizi. Pada kelompok talasemia tanpa hemokromatosis proporsi gangguan pada tinggi badan dan berat badan hanya sekitar separuhnya (berturut-turut 27,3 dan 13,1%), dan kekurangan gizi dijumpai pada 4,7% subyek. Penderita dengan hemokromatosis juga memperlihatkan nilai BMI yang lebih rendah secara bermakna dibandingkan pada kelompok tanpa hemokromatosis ($p < 0,050$).

5.2. KARAKTERISTIK PEMERIKSAAN LABORATORIUM PENUNJANG LAIN

Untuk mengetahui adanya kelebihan besi digunakan batasan nilai saturasi transferrin $\geq 55\%$.¹⁴ Pada kelompok penderita talasemia dengan hemokromatosis didapatkan rerata kadar saturasi transferrin yang jauh lebih tinggi (rerata 68,7%) dibanding pada kelompok kontrol (rerata 31,9%). Besi dalam tubuh harus selalu berada dalam keadaan terikat dengan protein agar tidak bersifat toksik. Kadar besi yang tinggi pada penderita talasemia mayor akibat absorpsi besi yang meningkat dan transfusi mengakibatkan pada sebagian apotransferrin pada kelompok hemokromatosis menjadi tersaturasi penuh.

Dari peneliti lain batasan saturasi besi yang digunakan sebagai batas nilai untuk menentukan adanya hemokromatosis bervariasi antara nilai saturasi transferrin

50-60%.^{42,43,48} Dari perhitungan hasil pada penelitian ini, didapatkan sensitivitas dan spesifitas untuk batasan saturasi transferrin 55% cukup baik, yaitu masing-masing 99,1% dan 89,4%. Batasan ini mungkin dapat digunakan sebagai petanda adanya kelebihan besi tubuh.

Pada penelitian ini juga dilakukan pemeriksaan hemoglobin, fungsi hati dan ginjal. Untuk data laboratorium didapatkan adanya perbedaan yang bermakna untuk parameter hemoglobin, SGOT, SGPT, albumin, ureum serta kreatinin. Sedangkan untuk parameter glukosa juga dijumpai adanya perbedaan yang bermakna antara kedua kelompok.

Pada penderita talasemia mayor dengan hemokromatosis didapatkan nilai rerata SGOT, SGPT dan albumin yang lebih tinggi dibandingkan pada kelompok kontrol, perbedaan ini bermakna secara statistik. Pemeriksaan ini dilakukan untuk menyingkirkan adanya gangguan fungsi hati yang beres karena hepsidin diproduksi oleh hati. Pada kelompok talasemia dengan hemokromatosis didapatkan berturut-turut 10,2 % dan 7,4% subyek dengan nilai SGOT dan SGPT lebih dari 3 kali nilai normal, peningkatan ini tidak dijumpai pada kelompok kontrol. Untuk pemeriksaan albumin didapatkan 0,9 % subyek pada kelompok talasemia dengan hemokromatosis mempunyai nilai albumin di bawah nilai batas bawah rujukan 3,5 g/dL, tidak didapatkan nilai albumin yang berada di bawah nilai rujukan pada kelompok kontrol.⁴⁹ Berdasarkan data di atas, dianggap fungsi sintesis hati dan integritas sel hati pada umumnya masih cukup baik. Meskipun demikian SGOT dan SGPT yang lebih tinggi pada penderita dengan hemokromatosis menggambarkan adanya gangguan fungsi dan integritas pada sel parenkim hati, dihubungkan dengan adanya deposit besi yang berlebih akibat

transfusi berulang pada kelompok penderita tersebut. Kadar albumin yang sedikit lebih rendah pada kelompok talasemia dengan hemokromatosis dapat mencerminkan adanya kekurangan pada asupan protein yang mungkin berkaitan dengan fungsi absorpsi usus pada kelompok tersebut. Albumin yang sedikit lebih rendah mungkin juga dapat diakibatkan berkurangnya fungsi sel parenkim hati dalam mensintesis albumin. Hasil SGOT dan SGPT yang lebih tinggi pada kelompok talasemia dengan hemokromatosis mungkin juga dihubungkan dengan riwayat penyakit yang berhubungan dengan transfusi darah berulang seperti hepatitis C. Salah satu komplikasi tersering pada pemberian transfusi darah secara berulang adalah terjadinya infeksi yang berkaitan dengan darah yang diberikan.³⁶ Data pada registrasi talasemia di Amerika menunjukkan bahwa 75% penderita di atas 25 tahun menderita hepatitis C.³⁷ Dari penelitian terdahulu pada tahun 1993 didapatkan bahwa sebagian besar penderita talasemia dengan transfusi berulang menderita hepatitis C yang dideteksi dengan adanya antibodi hepatitis C yang positif.³⁸

Pemeriksaan umum dan kreatinin dilakukan untuk menyingkinkan adanya gangguan fungsi ginjal yang dapat mengganggu pemeriksaan laktase yang menggunakan bahan pemeriksaan urin. Untuk tes fungsi ginjal perbedaan bermakna untuk kedua kelompok hanya dijumpai untuk parameter kreatinin saja. Pada pemeriksaan fungsi ginjal hasil pemeriksaan umum dan kreatinin untuk kelompok penderita talasemia dengan hemokromatosis dan kelompok kontrol tidak didapatkan nilai yang berada di luar rentang nilai rujukan.³⁴ Dianggap fungsi ginjal masih cukup baik dan pemeriksaan laktosa laktulosa dapat dilakukan pada seluruh subyek penelitian.

5.3. PEMERIKSAAN PENDAHULUAN PADA KELOMPOK SUBYEK SEHAT

Pada penelitian ini juga dilakukan penelitian mengenai laktase dan integritas usus pada kelompok subyek sehat. Hal ini dilakukan karena dari kepustakaan tidak dijumpai proporsi gangguan enzim laktase pada penderita talasemia tanpa hemokromatosis. Tidak banyak ditemukan penelitian mengenai pemeriksaan integritas dan fungsi usus halus menggunakan laktosa dan laktulosa. Begitu pula belum dijumpai adanya nilai rujukan untuk pemeriksaan laktase di kepustakaan. Pada pemeriksaan pendahuluan ini, rentang nilai ekskresi untuk laktosa dan laktulosa dan rasio laktosa laktulosa yang didapatkan digunakan sebagai nilai rujukan untuk menghitung proporsi gangguan enzim laktase kelompok talasemia tanpa hemokromatosis sebagai kelompok kontrol dalam menentukan estimasi besar sampel yang diperlukan.

5.4. PEMERIKSAAN FUNGSI PANKREAS

5.4.1. Pemeriksaan elastase 1 pankreas (E1)

Pengukuran elastase 1 pankreas (E1) dari tiga merupakan suatu pemeriksaan yang non invasif untuk mengetahui fungsi eksokrin pankreas. Pemeriksaan ini sering digunakan untuk mengetahui penurunan fungsi pankreas pada berbagai kelainan seperti fibrokistik pankreas, kegemaran pada pankreas, pankreatitis kronik, batu saluran empedu dan berbagai kelainan lain.^{99,100} Pemeriksaan E1 ini juga dapat digunakan untuk memonitor perkembangan fungsi pankreas pada bayi baru lahir.¹⁰⁰ Pemeriksaan E1 dapat dilakukan dengan menggunakan metoda mikroelisa yang relatif cukup mudah untuk dilakukan di laboratorium yang mempunyai alat baca mikroelisa. Terdapat reagensia yang

menggunakan antibodi monoklonal yang lebih spesifik terhadap elastase pankreas, atau menggunakan antibodi poliklonal.^{81,82} Pemeriksaan ini dianggap mempunyai sensitivitas dan spesifitas yang cukup tinggi untuk mendeteksi adanya gangguan fungsi eksokrin pankreas. Nilai EI ini dianggap juga mempunyai korelasi yang baik dengan derajat gangguan pada sel beta pankreas pada penderita diabetes melitus. Nilai rujukan yang digunakan untuk EI tinja adalah > 200 ug/g. Nilai yang lebih rendah menggambarkan adanya insufisiensi eksokrin pankreas.^{80,81}

Sebelum dilakukan penelitian pada penderita hemokromatosis, dilakukan penelitian pendahuluan pada talasemia tanpa hemokromatosis untuk mendapatkan proporsi gangguan eksokrin pankreas karena dari studi literatur tidak dijumpai adanya nilai proporsi gangguan eksokrin pankreas pada penderita talasemia yang belum mengalami hemokromatosis. Nilai yang diperoleh digunakan untuk perhitungan estimasi besar sampel untuk pemeriksaan elastase yang diperlukan.

Pada penelitian ini didapatkan rerata aktivitas EI elastase pada kelompok penderita talasemia dengan hemokromatosis 197,4 ug/g, lebih rendah secara bermakna dibandingkan dengan nilai pada kelompok kontrol dengan rerata nilai elastase 328,8 ug/g tinja ($p=0,000$). Lembar pada penelitiannya juga mendapatkan adanya penurunan fungsi eksokrin pankreas dengan proporsi sebesar 20,31% pada penderita talasemia β mayor.⁷⁸ Didapatkan pada penelitian ini proporsi penderita talasemia mayor yang mempunyai EI rendah adalah 55,9% sedangkan pada kelompok kontrol didapatkan proporsi hanya sebesar 14,7%. Rerata EI pankreas pada kelompok talasemia dengan hemokromatosis yang lebih rendah dibandingkan kelompok tanpa hemokromatosis ini menggambarkan bahwa fungsi eksokrin pankreas pada subyek dengan kelebihan besi telah mengalami insufisiensi.

Begitu pula bila dilihat secara proporsal, pada kelompok talasemia dengan hemosiderosis dijumpai lebih banyak subyek yang mempunyai insufisiensi kelenjar endokrin pankreas. Adanya kelainan kelebihan besi menyebabkan peningkatan besi bebas NTBI yang dapat menyebabkan terjadinya reaksi Fenton dan menimbulkan berbagai radikal lanjutan dan terbentuknya radikal bebas yang bersifat toksik pada sel parenkim pankreas. Hal ini dapat menyebabkan kerusakan pada membran sel dan gangguan fungsi sel di pankreas.^{17,18,41} Gangguan produksi enzim endokrin pankreas akan mengakibatkan gangguan pada bekerjanya enzim lain di usus halus.²²

Gangguan enzim yang diteliti adalah elastase, kemungkinan enzim endokrin pankreas lain juga dapat mengalami gangguan. Adanya gangguan produksi enzim pankreas akan berakibat pada fungsi digesti nutrisi di usus halus sehingga juga mempengaruhi jumlah nutrisi yang dapat diabsorpsi. Pemberian enzim per oral sebagai suplementasi dapat dipertimbangkan untuk digunakan sebagai salah satu alternatif penanganan berkurangnya produksi enzim pankreas tersebut.

Pada batas nilai rujukan yang digunakan sebesar 200 mg/g, didapatkan nilai sensitivitas dan spesifisitas pemeriksaan elastase hanya 49% dan 17,3%, dengan kemungkinan mendapatkan nilai tersebut hanya 22,6%. Hal ini tidak sama dengan hasil yang dilaporkan oleh peneliti lain yang mendapatkan nilai-nilai yang lebih tinggi. Hal ini mungkin disebabkan karena kelompok kontrol pada penelitian ini adalah kelompok talasemia yang mungkin juga sudah mengalami gangguan pada pankreas, sedangkan pada penelitian lain kelompok kontrol yang digunakan adalah kelompok kontrol normal. Nilai yang terlihat pada kurva ROC pada penelitian ini mungkin tidak menggambarkan nilai yang akan diperoleh bila yang digunakan sebagai kontrol adalah kelompok yang sehat.

5.4.2. Pemeriksaan fungsi endokrin pankreas

Pada penderita talasemia dengan hemokromatosis didapatkan rerata kadar glukosa darah sewaktu yang sedikit lebih tinggi secara bermakna. Hal ini mungkin juga menggambarkan adanya gangguan fungsi endokrin pankreas pada talasemia dengan kelebihan besi. Telah banyak dilaporkan adanya peningkatan kadar glukosa darah pada penderita talasemia mayor.^{23, 41, 201}

5.5. PEMERIKSAAN FUNGSI DAN INTEGRITAS USUS HALUS

5.5.1. Pemeriksaan enzim laktase dan integritas usus halus

Pada penelitian ini digunakan cara yang tidak langsung dan non-invasif untuk menilai fungsi dan integritas usus halus. Pemeriksaan secara langsung sulit dilakukan karena umumnya dilakukan dengan pemeriksaan yang cukup invasif karena memerlukan tindakan endoskopi dan biopsi, pemberian zat radioaktif dan diukur kadarnya dalam tubuh atau tindakan invasif lain.^{27, 28, 102}

Sebagai alternatif dapat dilakukan pemeriksaan lain secara tak langsung antara lain menggunakan tes pembebanan suatu karbohidrat tertentu, biasanya merupakan satu atau beberapa karbohidrat lalu diukur derajat absorpsinya sebagai substrat dalam darah atau sebagai hasil ekskresinya di urin. Dari berbagai enzim yang ada di usus halus, yang dipilih pada penelitian ini adalah laktase dan dilakukan tes pembebanan menggunakan laktosa. Laktase dipilih karena susu merupakan salah satu sumber protein yang cukup banyak dikonsumsi oleh anak. Pada penelitian ini juga dipilih cara deteksi menggunakan KCKT dari hasil ekskresi substrat di urin, karena dianggap cara ini lebih sensitif.

Pada penelitian ini digunakan pembebanan laktosa bersamaan dengan laktulosa, disakarida yang mempunyai bentuk dan sifat yang mirip. Laktosa setelah mengalami hidrolisis oleh enzim laktase akan menjadi monosakarida glukosa dan galaktosa yang akan diabsorpsi melalui reseptornya dipermukaan apikal enterosit.^{89,97} Bila laktase kurang atau tak ada maka laktosa tidak mengalami hidrolisis dan dapat masuk melalui jalur paraselular untuk kemudian diekskresikan melalui urin. Laktulosa dalam keadaan normal tidak dihidrolisis di usus halus dan dapat masuk secara utuh melalui paraselular bila terdapat gangguan pada *tight junction* enterosit. Ekskresi laktosa dan laktulosa di urin menggambarkan baik fungsi enterosit sebagai penghasil enzim laktase atau integritas *tight junction* yang dinilai dari kemampuan permeasi laktulosa. Pada upaya mengetahui integritas usus dapat digunakan karbohidrat lain seperti manitol, laktulosa atau raminosa.¹⁰⁰⁻¹⁰⁴ Pada penelitian ini dipilih laktulosa karena laktulosa mempunyai bentuk molekul yang menyerupai laktosa, tidak terdapat enzim dalam tubuh manusia yang akan menghidrolisisnya serta mempunyai jalur paraselular yang sama dengan laktosa. Penelitian menggunakan laktulosa sering digunakan oleh peneliti lain untuk mengetahui adanya gangguan integritas atau kebocoran usus (*leaky gut*) pada berbagai kelainan seperti penyakit *celiac*, alergi makanan, bakteri tumbuh lampau. Dianggap bahwa pada keadaan ini molekul kecil seperti manitol dan raminosa akan masuk melalui transeular melalui pori kecil sedangkan molekul yang lebih besar laktulosa dan laktosa akan melalui jalur paraselular yang diatur dengan adanya *tight junction*. Miki pada penelitiannya mendapatkan laktulosa urin pada orang sehat sebesar $1,15 \pm 0,03$ mmol/L.

Peningkatan ekskresinya menggambarkan adanya gangguan fungsi tight junction di usus.¹⁰²

Pada penelitian ini didapatkan hasil validasi pemeriksaan masih dalam batas yang diperbolehkan dengan nilai perolehan kembali laktosa dan laktulosa urin 90,66-112,20% dan 88,01-107,69%. Pada penelitian ini dicoba untuk mencari baku dalam (*internal standard*) menggunakan karbohidrat lain, akan tetapi didapatkan adanya hasil yang berhimpit dengan komponen pengganggu lain dalam urin sehingga tidak dapat digunakan. Karbohidrat lain yang dicoba adalah tagatosa, fruktosa, dan galaktosa. Oleh karena itu pada penelitian ini tidak digunakan baku dalam lain.

Pada anak dengan kelebihan besi akan terjadi berbagai kelainan pada sel akibat stres oksidatif dan peroksidasi lipid, termasuk pada sel usus. Lumen usus dilapisi oleh sel enterosit yang berfungsi pada transport nutrisi, bila terjadi stres oksidatif akan timbul reaksi inflamasi dan destruksi jaringan. Berarti pada penelitiannya menggunakan sel usus dan memajarkannya dengan larutan yang mengandung besi, mendapatkan bahwa akan terjadi perubahan pada sel tersebut. Didapatkan bahwa pemajaran tersebut akan menyebabkan perubahan pada permeabilitas membran sel dan mengganggu sawar mukosa usus serta berpotensi untuk merusak sel usus.¹⁰³

Meskipun pemeriksaan absorpsi karbohidrat dilakukan dengan 2 macam gula, hasil yang diperoleh dapat diinterpretasikan masing-masing. Pemeriksaan dengan manitol dan laktulosa umumnya dilakukan bersamaan. Manitol akan menilai ambilan (*splaye*) transelular sedangkan laktulosa merupakan penanda integritas mukosa. Dilaporkan bahwa terdapat gangguan permeasi laktulosa pada

gangguan fungsi eksokrin pankreas. Secara tak langsung pemeriksaan laktulosa dapat digunakan juga untuk menilai fungsi eksokrin pankreas. Pemeriksaan juga dapat dilakukan dengan pasangan karbohidrat lain seperti sukrosa dan laktulosa. Penilaian ini digunakan untuk menilai integritas usus halus.¹¹⁴

Contoh pada penelitiannya juga mendapatkan bahwa adanya besi berlebih atau bebas menyebabkan terjadinya reaksi peroksidasi lipid.¹¹⁵ Pada keadaan dengan peningkatan NTBI atau LPI kemungkinan terjadinya radikal bebas meningkat, disertai peningkatan kemungkinan terjadinya kerusakan sel pada berbagai organ.¹¹⁴

5.5.2. Pemeriksaan laktase pada penderita hemokromatosis

Pada kelompok penderita talasemia dengan hemokromatosis didapatkan nilai median aktivitas laktase 1,25, sedikit lebih tinggi dibandingkan pada kelompok kontrol dengan median aktivitas laktase 1,0. Tidak didapatkan perbedaan yang bermakna antara kelompok dengan hemokromatosis dan kontrol untuk laktase. Semakin tinggi nilai laktase yang merupakan rasio antara laktosa dan laktulosa maka semakin tinggi laktosa yang diekskresikan di urin, dan menandakan semakin rendahnya aktivitas laktase di usus. Enzim laktase pada kelompok subjek yang tidak sering mengkonsumsi susu, umumnya mengalami penurunan aktivitas sejak penyapihan. Kelompok non peminum ini banyak dijumpai di Asia, termasuk Indonesia, dan dapat mengalami malabsorpsi laktosa bila mengkonsumsi susu berlebih terutama pada usia yang lebih tua.^{115,116} Pada penelitian ini mungkin telah terjadi penurunan aktivitas laktase pada kelompok kontrol yang rerata usianya lebih tua sehingga perbedaan yang ada dengan kelompok hemokromatosis tidak memberikan perbedaan yang bermakna.

Pada kelompok dengan hemokromatosis didapatkan proporsi laktase yang abnormal pada 12,2% subyek, sedangkan pada kelompok kontrol didapatkan proporsi abnormal sebesar 10%. Meskipun proporsi laktase abnormal pada kelompok talasemia dengan hemokromatosis sedikit lebih tinggi tetapi secara statistik tidak berbeda bermakna. Peningkatan proporsi pada keadaan kelebihan besi mungkin dapat menggambarkan adanya gangguan produksi enzim laktase pada kelompok hemokromatosis. Mungkin adanya peningkatan besi bebas pada kelompok tersebut akan mempengaruhi produksi laktase. Laktase adalah enzim yang diproduksi di bagian apikal vilus usus halus oleh karena itu lebih rentan terhadap berbagai pajanan dan lebih sering mengalami gangguan.^{22,23}

Pada perhitungan didapatkan bahwa pemeriksaan laktase untuk menilai fungsi usus mempunyai sensitivitas dan spesifisitas 63,2 % dan 37,9 % untuk nilai batas laktase 1,1 dengan kemungkinan mendapatkan nilai tersebut 54,2%. Sedangkan bila digunakan batas rasio 2,11 didapatkan nilai sensitivitas dan spesifisitas 0,551 dan 0,568. Gambaran pada sensitivitas, spesifisitas dan kurva ROC yang tidak begitu baik mungkin disebabkan karena pada perhitungannya dilakukan hanya pada kelompok yang mempunyai kelainan talasemia. Bila digunakan subyek sehat mungkin dapat memberikan gambaran yang berbeda.

5.5.3. Pemeriksaan laktase dengan pembandingan kelompok sehat

Pada penelitian pendahuluan diambil masing-masing 20 subyek sehat, talasemia dengan hemokromatosis dan tanpa hemokromatosis. Dari nilai yang diperoleh dapat diperhatikan bahwa pada kelompok penderita talasemia, ekskresi laktosa dan laktulosa di urin yang menggambarkan jumlah masing-masing karbohidrat yang diabsorpsi jauh lebih tinggi dibanding kelompok subyek sehat.

Oleh karena itu dilakukan perhitungan lain dengan membandingkan antara kelompok subjek sehat dengan kelompok talasemia dengan hemokromatosis dan talasemia tanpa hemokromatosis. Juga dibandingkan antar kelompok talasemia. Terdapat perbedaan bermakna antara kelompok subjek sehat dengan kelompok talasemia baik dengan atau tanpa hemokromatosis ($p < 0,05$), tetapi tak ada perbedaan bermakna antara kelompok talasemia dengan hemokromatosis dan tanpa hemokromatosis ($p > 0,05$). Hal ini mungkin disebabkan karena perubahan pada mukosa usus penderita talasemia sudah terjadi sebelum adanya kelebihan besi atau pada batasan saturasi transferin belum mencapai 55%. Perbedaan rasio tungkai hila dibandingkan antara subjek sehat dengan subjek dengan talasemia tanpa hemokromatosis maupun dengan hemokromatosis.

Galpin dkk. pada penelitiannya menggunakan pemeriksaan tersebut untuk menilai integritas usus halus serta kemampuan absorpsi makromolekul pada anak dengan enteropati yang mendapat terapi *Lactobacillus*. Pada penelitiannya didapatkan rasio laktulosa urin/asupan 0 - 0,59 pada anak dengan enteropati tropikal. Pada penelitian ini rasio laktulosa urin/asupan yang didapat pada kelompok sehat adalah 0 - 0,004, pada kelompok hemokromatosis adalah 0,011 dan pada kelompok talasemia tanpa hemokromatosis adalah 0 - 0,010.¹⁰⁶ Tampaknya nilai laktulosa yang diabsorpsi dan dianalisis di urin pada kelompok talasemia baik dengan atau tanpa hemokromatosis lebih rendah dibanding pada keadaan enteropati. Hal ini mungkin disebabkan karena gangguan pada *tight junction* belum begitu bermanifestasi dibandingkan dengan pada keadaan enteropati usus.

Terdapat berbagai enzim untuk digesti di usus halus, enzim untuk digesti karbohidrat termasuk enzim disakaridase seperti laktase, sukrase dan maltase. Pada penelitian ini hanya diteliti enzim laktase, tetapi gangguan mungkin juga dapat terjadi pada enzim disakarida atau enzim protease lain. Gangguan pada enzim ini akan menyebabkan terganggunya proses digesti nutrien di usus halus sehingga mengurangi absorpsi nutrien. Hal ini mungkin dapat menerangkan adanya gangguan pada proporsi tubuh penderita talasemia mayor yang sering tidak dapat dikoreksi meskipun pemberian kebutuhan nutriennya sudah dipenuhi.^{24,207} Pemberian suplementasi enzim yang dianggap kurang mungkin dapat membantu proses digesti dan meningkatkan absorpsi nutrien.

5.6. KORELASI SATURASI TRANSFERIN DAN NTBI DENGAN ELASTASE DAN LAKTOSA LAKTULOZA (LAKTASE)

Pada penelitian ini dipilih saturasi transferin untuk mencari korelasi karena saturasi transferin menggambarkan banyaknya besi tubuh yang terikat pada protein pengangkut, sedangkan NTBI mewakili komponen besi yang berada dalam keadaan bebas dan mudah berikatan dengan molekul dan dan menimbulkan berbagai reaksi. Pada peningkatan besi tubuh terutama bila besi dalam keadaan bebas maka secara potensial yang akan bersifat toksik adalah komponen NTBI.⁹⁷

Pada talasemia terutama mayor dapat terlihat hubungan antara waktu dan kelebihan besi dan kerusakan organ yang terjadi. Pada penelitian ini dicoba untuk mencari korelasi antara parameter besi dengan fungsi pankreas dan usus halus yang digambarkan dengan aktivitas elastase dan laktase. Dilakukan penghitungan ulang estimasi sampel untuk uji korelasi NTBI dengan elastase karena jumlah penghitungan awal menghasilkan nilai n yang sangat besar. Dari hasil penghitungan

ulang dengan seluruh nilai yang didapat, ternyata dihasilkan jumlah sampel 46 subyek dan mencukupi, sehingga uji korelasi tetap dapat dihitung dalam penelitian ini

Terdapat korelasi negatif sedang antara saturasi transferrin dan NTBI terhadap elastase I pankreas. Hal ini menggambarkan bahwa semakin tinggi saturasi besi atau NTBI, semakin berat gangguan eksokrin pankreas yang terjadi. Hanya besi atau NTBI, semakin berat gangguan eksokrin pankreas yang terjadi. Hanya terdapat korelasi negatif lemah antara ekskresi laktulosa dengan saturasi transferrin. Hal ini menggambarkan bahwa semakin tinggi saturasi transferrin semakin besar terjadi gangguan integritas usus. Bila dilihat dari kelompok subyek sehat - talasemia dengan dan tanpa hemokromatosis ($n=60$) maka terdapat korelasi lemah antara saturasi transferrin dengan aktivitas laktase ($p < 0,05$). Semakin tinggi saturasi transferrin semakin berkurang enzim laktase usus halus. Terdapat korelasi sedang antara rasio hepsidin/feritin dengan elastase ($r=0,412$, $p=0,000$) dan korelasi lemah dengan laktulosa urin ($r=0,227$, $p=0,004$). Adanya korelasi ini menggambarkan bahwa semakin tinggi hepsidin/feritin semakin besar kemungkinan terjadinya gangguan fungsi eksokrin pankreas. Begitu pula dengan saturasi transferrin, semakin tinggi saturasi transferrin, semakin besar kemungkinan terjadinya disfungsi pankreas yang dalam hal ini dilihat dari produksi enzim elastasenya

5.7. EKSPRESI HEPSIDIN PADA TALASEMIA

5.7.1. Ekspresi hepsidin pada hemokromatosis

Hepsidin merupakan suatu hormon pengatur homeostasis besi tubuh. Pada penelitiannya Papanicolaou mendapatkan penurunan kadar hepsidin pada hampir semua penderita hemokromatosis atau talasemia, tetapi hepsidin juga dapat

dijumpai meningkat pada hemokromatosis. Hepsidin bekerja pada ferroportin, tempat keluarnya besi dari sel. Ferroportin dapat dijumpai pada semua sel yang mempunyai besi.^{71, 98-100}

Ekspresi hepsidin dapat dinyatakan dalam kadar maupun sebagai rasio antara hepsidin terhadap feritin. Rasio hepsidin/feritin pada orang normal nilainya adalah mendekati 1, menggambarkan respons hepsidin terhadap besarnya cadangan besi tubuh. Pada keadaan talasemia mayor dengan transfusi berulang dapat dijumpai gangguan pada pengaturan hepsidin.^{110,112} Dari berbagai laporan penelitian di kepustakaan kadar hepsidin umumnya menurun pada keadaan dengan eritropoiesis aktif, termasuk pada penderita talasemia.^{38,39,84} Origa pada penelitiannya mengenai hepsidin urin pada β talasemia mendapatkan bahwa pada talasemia mayor kadar hepsidin meningkat, lebih tinggi dari talasemia intermedia. Pada talasemia mayor kadar hepsidin berkisar antara 16-784 ng/mg kreatinin sedangkan pada talasemia intermedia 4-38 ng/mg kreatinin dengan nilai rujukan 10-200 ng/mg kreatinin pada subjek normal.³⁸ Pada penelitian ini meskipun terdapat perbedaan nilai rerata kadar hepsidin pada kelompok dengan hemokromatosis yang lebih tinggi dibanding kelompok kontrol, perbedaan ini tidak bermakna secara statistik. Hal ini mungkin dapat disebabkan adanya kelebihan besi yang sangat tinggi seperti yang tercermin dari kadar feritin yang sangat meningkat, yang juga terdapat pada kelompok kontrol mengakibatkan ekspresi hepsidin sangat bervariasi. Untuk melihat peran hepsidin sebagai regulator cadangan besi, pada penelitian ini dilakukan perhitungan hepsidin sebagai rasio hepsidin/feritin. Dalam keadaan normal rasio hepsidin/feritin adalah mendekati nilai 1.¹⁰²

Origa mendapatkan hasil rasio hepsidin/feritin pada talasemia mayor adalah 0,02 - 0,30 (median 0,10), pada talasemia intermedia didapatkan hasil lebih rendah, yaitu 0,005 - 0,12 (median 0,01). Pada penelitian ini didapatkan rasio pada talasemia mayor sangat bervariasi, antara 0,009 - 8,01 (rerata 0,08) dan pada kontrol 0,017 - 43,3 (rerata 1,8). Perbedaan antara kedua kelompok bermakna secara statistik ($p=0,000$). Di kepustakaan dari negara maju umumnya dijumpai kadar hepsidin yang rendah pada penderita talasemia mayor.^{109,111,112} Pada penelitian ini juga dijumpai adanya rasio hepsidin/feritin yang sangat rendah pada penderita talasemia dengan hemokromatosis dibandingkan pada kelompok kontrol. Hal ini menggambarkan tidak adekuatnya peningkatan hepsidin sebagai respons terhadap peningkatan jumlah cadangan besi tubuh. Kelompok talasemia dengan hemokromatosis pada penelitian ini mempunyai kadar feritin yang sangat tinggi, berbeda dengan keadaan di negara maju yang menggunakan terapi kelasi secara rutin. Hal ini menyebabkan kadar feritin di negara maju tidak setinggi Indonesia, dan hepsidin di negara maju juga tidak setinggi seperti yang dijumpai pada penelitian ini.

Gardenghi pada penelitiannya mendapatkan bukti bahwa eritropoiesis yang tidak efektif dan kelebihan besi pada tikus dengan talasemia mengatur perubahan pada hepsidin.¹¹¹ Pada tikus yang muda, ekspresi hepsidin akan menurun pada talasemia, sedangkan pada tikus yang lebih tua kadar hepsidin lebih tinggi menyamai kadar pada kontrol normal. Peningkatan hepsidin ini juga disertai dengan peningkatan ferroportin. Bila dilakukan transfusi maka kadar hepsidin akan berubah karena eritropoiesis yang berubah.¹¹² Pada penelitian terdahulu didapatkan bahwa kadar hepsidin pada penderita talasemia mayor yang mendapat transfusi

akan menurun dibandingkan nilai sebelumnya.¹¹⁴ Katamis pada penelitiannya mendapatkan kadar hepsidin urin pada penderita talasemia berkisar antara 11,2-433 ng/mg kreatinin, bila dilakukan transfusi maka kadar hepsidin urin yang didapat sangat bervariasi dengan median perbedaan sebesar 164%.¹¹⁵

Dari perhitungan model ternyata banyak faktor yang akan mempengaruhi ekspresi hepsidin. Faktor yang mempengaruhinya adalah banyaknya besi terikat maupun bebas, banyaknya protein pengangkut besi serta jumlah dan lama transfusi darah yang telah diberikan. Dengan kemajuan perkembangan ilmu, sedang dilakukan pengembangan terapi pemberian hepsidin atau GDF15, suatu faktor pertumbuhan eritrosit imatur yang akan merangsang ekspresi hepsidin di hepatosit untuk mengurangi absorpsi besi oleh enterosit.¹¹⁷ Adanya model untuk memperhitungkan ekspresi hepsidin akan membantu pemberian terapi semacam itu.

Untuk mengetahui penggunaan pemeriksaan hepsidin sebagai prediktor adanya gangguan homeostasis besi tubuh, dilakukan penghitungan sensitivitas dan spesifisitas pada berbagai *cut off point* berdasarkan kurva ROC untuk hepsidin. Bila digunakan batas nilai hepsidin 258,2 ug/mL, didapatkan nilai sensitivitas dan spesifisitas sebesar 55,52 % dan 51,1 %, dengan kemungkinan mendapatkan nilai tersebut sebesar 50,5%. Nilai ini mungkin masih dapat digunakan meskipun sensitivitas dan spesifisitasnya tidak begitu tinggi. Pada pembuatan kurva ROC dan menentukan nilai *cut off* sebaiknya memang kelompok yang digunakan merupakan gabungan antara subyek sehat dan subyek abnormal. Pada penelitian ini tidak digunakan kelompok subyek sehat, sehingga bentuk kurva yang didapat tampak seperti tidak sebaik yang diharapkan.

5.7.2. Pengaruh jumlah besi tubuh dan eritropoiesis terhadap hepsidin

Pada penelitian ini juga dijumpai kadar hepsidin lebih tinggi dibandingkan yang dilaporkan oleh peneliti lain, oleh karena itu dilakukan uji korelasi untuk melihat hubungan antara hepsidin dengan retikulosit yang menggambarkan proses eritropoiesis dan parameter besi lain sebagai penanda cadangan besi tubuh. Tampak adanya korelasi negatif yang baik dan bermakna antara rasio hepsidin/feritin terhadap kadar besi serum, saturasi transferin serta NTBI. Hal ini menyokong peran hepsidin sebagai regulator cadangan besi tubuh. Semakin tinggi kadar hepsidin semakin kurang besi yang dapat masuk melalui absorpsi sehingga jumlah besi di sirkulasi akan berkurang.

Perhitungan korelasi hepsidin/feritin juga dilakukan terhadap retikulosit yang merupakan fraksi eritrosit muda yang ada di darah tepi. Retikulosit di darah tepi dapat diukur sebagai IRF, yaitu bentuk fraksi retikulosit yang masih mempunyai sisa RNA dan DNA, yang dapat diukur menggunakan metoda fluoresensi dengan *flowcytometry*. Fraksi IRF dapat dikelompokkan menjadi kelompok yang memancarkan fluoresensi rendah, sedang dan tinggi. Fraksi HFR adalah retikulosit yang memancarkan fluoresensi tertinggi, merupakan fraksi retikulosit yang termuda di darah tepi.⁴¹ Pada penelitian ini dijumpai korelasi negatif lemah hingga sedang yang bermakna antara rasio hepsidin/feritin dengan berbagai fraksi retikulosit. Korelasi tampak lebih baik bila dilihat dengan menggunakan fraksi HFR yang merupakan retikulosit yang baru diproduksi sumsum tulang dan lebih bermakna dalam menilai aktivitas eritropoiesis. Hal ini menyokong pendapat bahwa hepsidin dipengaruhi aktivitas eritropoiesis. Semakin

tinggi aktivitas eritropoiesis semakin sedikit ekspresi hepsidin, sehingga makin banyak besi yang dapat masuk melalui enterosit usus.

5.7.3. Hepsidin dan inflamasi - infeksi

Tidak didapatkannya perbedaan yang bermakna antara hepsidin pada kelompok hemokromatosis dan tanpa hemokromatosis mungkin juga dapat disebabkan karena ekspresi hepsidin tubuh selain dipengaruhi oleh status besi tubuh dan eritropoiesis juga dipengaruhi oleh adanya inflamasi dan infeksi. Kadar hepsidin tubuh dapat dipengaruhi oleh sitokin yang terbentuk pada saat inflamasi, seperti IL-6. Salah satu komplikasi yang sering meningkatkan morbiditas dan mortalitas penderita talasemia mayor adalah sering terjadinya inflamasi atau infeksi. Hal ini mungkin menyebabkan kesulitan dalam membandingkan kadar hepsidin pada penderita tersebut.¹¹¹ Pada penelitian ini dilakukan perhitungan korelasi antara rasio hepsidin/feritin dengan jumlah relatif neutrofil di darah tepi yang merupakan komponen yang akan meningkat bila terdapat infeksi bakterial. Karena merupakan jumlah relatif, peningkatan neutrofil akan mengakibatkan turunnya fraksi limfosit. Dijumpai adanya korelasi positif lemah yang bermakna antara rasio hepsidin/feritin dengan jumlah relatif neutrofil dan korelasi negatif dengan jumlah relatif limfosit. Semakin tinggi neutrofil sebagai petanda infeksi, semakin tinggi ekspresi hepsidin.

5.8. STATUS BESI TUBUH PADA TALASEMIA

5.8.1. Status besi tubuh pada talasemia dengan hemokromatosis

Dari pemeriksaan yang telah dilakukan, didapatkan adanya perbedaan yang bermakna berbagai parameter besi tubuh antara kelompok penderita

talasemia mayor dengan kelompok kontrol. Kelompok hemokromatosis mempunyai jumlah besi tubuh yang lebih tinggi dibandingkan kelompok kontrol. Terdapat perbedaan yang bermakna untuk parameter kadar besi tubuh, daya ikat besi tubuh, ferritin, dan NTBI.

Pada penelitian ini nilai standar transferin yang digunakan sebagai batas adanya hemokromatosis adalah 55%. Pada perhitungan menggunakan kurva ROC, pada batas nilai 55% ternyata didapatkan nilai sensitivitas dan spesifisitas yang terbaik, sehingga nilai batas tersebut memang merupakan nilai terbaik untuk digunakan sebagai prediktor adanya hemokromatosis. Dari perhitungan didapatkan nilai sensitivitas dan spesifisitas yang baik untuk batas kadar ferritin 1145 ng/mL, yaitu 91,0 % dan 89,4 %. Saat ini umumnya batasan yang digunakan untuk mulai memberikan terapi kelasii bervariasi, yaitu saat kadar ferritin berkisar antara 1000-3000 ng/mL. Di Pusat Talasemia Rumah Sakit Dr. Cipto Mangunkusumo digunakan batasan ferritin 1000 ng/mL.^{41,107} Hasil yang didapat dari penelitian ini menunjukkan bahwa ferritin dapat digunakan sebagai prediktor adanya hemokromatosis pada kadar sekitar 1000 ng/mL, sesuai dengan nilai yang digunakan di Pusat Talasemia Rumah Sakit Dr. Cipto Mangunkusumo.

Pada nilai batas hepsidin 258,2 ug/mL, didapatkan nilai sensitivitas tertinggi, yaitu 55,52 % dan spesifisitas 51,1 %. Belum dijumpai dalam kepustakaan mengenai nilai batas rujukan ekspresi hepsidin sebagai petanda gangguan homeostasis besi tubuh. Untuk pemeriksaan NTBI belum dijumpai di kepustakaan adanya batasan nilai batas untuk menentukan adanya kelebihan besi bebas. Pada penelitian ini didapatkan nilai batas NTBI 2,43 μ U/mL, dengan sensitivitas 93,2 %

dan spesifisitas 96,4 %. Batas nilai ini dapat digunakan sebagai petanda adanya hemokromatosis dengan kelebihan besi bebas di sirkulasi.

5.8.2. Status besi tubuh dan transfusi darah

Rerata jumlah darah *packed cell* yang diberikan ke penderita talasemia dengan hemokromatosis mencapai 22.063 mL. Bila 1 mL darah mengandung 0,47 mg besi, maka melalui transfusi hal ini setara dengan penambahan 20,7 g besi, atau sebesar 273 mg setiap bulannya. Gejala kelebihan besi akan tampak bila penambahan besi telah mencapai 15-20 g besi.¹¹⁴ Bila dilihat dari proporsi besi badannya maka terjadi penambahan 646 mg per kilogram berat badan penderita, di luar penambahan besi melalui peningkatan absorpsi besi di enterosit usus. Pada orang dewasa, diperkirakan penambahan besi melalui transfusi mencapai 20-30 mg per hari atau 0,4 mg/kg berat badan per hari. Pada penelitian ini rerata penambahan besi melalui transfusi adalah 1,2 mg/kg berat badan per hari, tiga kali lipat lebih tinggi dari yang dilaporkan oleh peneliti lain di negara maju.¹¹⁵ Hal tersebut akan mempercepat terjadinya hemokromatosis sekunder dengan segala komplikasinya bila tidak dilakukan terapi.

Akumulasi besi dalam tubuh penderita talasemia mengakibatkan berbagai gangguan yang akan meningkatkan morbiditas dan mortalitas penderitanya bila tidak dilakukan terapi kelasi. Penyebab kematian tersering yang dilaporkan terjadi pada talasemia gangguan jantung seperti gagal jantung, aritmia serta infark miokardium, selain itu penyebab kematian lainnya adalah infeksi, sinus, trombozis serta penyebab lain. Sebagai petanda untuk mengetahui batas aman kadar besi tubuh digunakan parameter ferritin < 2.500 ug/L, besi dalam hati < 2 mg/g berat kering atau dengan pemeriksaan resonansi magnetik.¹¹⁶ Pada

penelitian ini nilai batas yang didapat untuk terjadinya kelebihan besi adalah untuk feritin 1145 ug/L, saturasi 55% dan NTBI 2,43 μ U/mL.

Pada penelitian ini dijumpai adanya korelasi positif antara saturasi transferin, NTBI dan feritin terhadap jumlah darah yang diberikan dan beban pertambahan darah per satuan berat badan penderita. Semakin kerap dan banyak transfusi yang diberikan semakin meningkat jumlah beban kelebihan besi yang ada. Dapat diprediksi jumlah kenaikan masing-masing parameter saturasi dan feritin berdasarkan jumlah darah yang diberikan. Karena pemeriksaan NTBI merupakan pemeriksaan yang relatif baru dan hanya dapat dilakukan pada pusat penelitian tertentu di beberapa negara saja, dilakukan perhitungan prediksi kadar NTBI berdasarkan kadar saturasi transferin. Dipilih pemeriksaan saturasi transferin karena pemeriksaan ini relatif mudah dilakukan dengan menggunakan peralatan standar berupa fotometer yang umum tersedia di laboratorium biasa. Diharapkan hal tersebut dapat digunakan untuk memprediksi terjadinya peningkatan besi bebas di sirkulasi yang bersifat toksik.

5.9. PENERAPAN HASIL PENELITIAN

5.9.1. Penerapan untuk sistem gastrointestinal

Secara umum pada penelitian ini dijumpai adanya gangguan fungsi pada pankreas dan saluran cerna yang mempunyai hubungan dengan kelebihan besi tubuh. Pada anak dengan talasemia dan kelebihan besi, dijumpai adanya penurunan kadar elastase E1 pankreas tua yang menggambarkan insufisiensi kelenjar eksokrin pankreas. Pada pemeriksaan aktivitas laktase dijumpai adanya sedikit penurunan aktivitas laktase yang meskipun tidak signifikan tetapi mungkin dapat

menggambarkan adanya disfungsi pada usus halus. Bila dibandingkan dengan kelompok subyek normal maka terdapat perbedaan yang bermakna antara subyek normal dan kedua kelompok talasemia, baik dengan hemokromatosis maupun tanpa hemokromatosis. Hal ini mungkin dapat menerangkan tidak adanya perbedaan bermakna antara kelompok hemokromatosis dengan kelompok kontrol talasemia tanpa hemokromatosis. Kemungkinan meskipun belum terjadi kelebihan besi tetapi pada penderita talasemia tersebut telah terjadi perubahan pada mukosa usus halusnya. Tampaknya sejak awal pemberian terapi transfusi pada penderita talasemia mayor sudah perlu diperhitungkan kemungkinan terjadinya gangguan pada sistem gastrointestinal, karena semakin tinggi kadar saturasi transferin semakin terganggu fungsi gastrointestinal.

Proses tumbuh kembang anak dengan talasemia umumnya tidak optimal, selain akibat gangguan pada eritropoiesis yang tidak efektif tampaknya juga disebabkan karena keadaan kelebihan besi yang dialaminya. Hal ini terlihat dari hasil perhitungan gizi anak pada kelompok dengan hemokromatosis mempunyai nilai BMI yang lebih rendah dibandingkan dengan kelompok kontrol, dan juga proporsi anak dengan kelainan tinggi dan berat badan juga lebih tinggi. Bila gangguan fungsi eksokrin pankreas yang dijumpai pada penelitian ini dapat diperbaiki, misalnya dengan pemberian enzim pankreas, mungkin hal tersebut akan sedikit membantu proses digesti dan absorpsi nutrisi yang ada, dan mungkin akan mencegah terjadinya gangguan pada status gizi tubuhnya. Begitu pula dengan gangguan pada enzim laktase, mungkin dapat dipertimbangkan untuk melakukan suplementasi enzim usus halus agar proses pencernaan menjadi lebih baik dan pertumbuhan anak lebih baik.

5.9.2 Penerapan untuk pencegahan hemokromatosis

Bila pada penderita talasemia diberikan nutrisi yang cukup maka seringkali perhatian hanya terlihat pada penambahan berat badan, sedangkan penambahan tinggi badan tetap tidak terkejar. Hal ini berhubungan dengan adanya anoksia menahun pada jaringan dan adanya sifat toksisitas besi bebas akibat deposit besi pada sel parenkim organ tubuh. Adanya anoksia dapat dicegah dengan memberikan transfusi berulang, tetapi kelebihan besi dilakukan dengan memberikan terapi kelasi. Akhir-akhir ini berkembang penelitian mengenai penggunaan hepsidin sebagai pencegah terjadinya absorpsi besi berlebih melalui enterosit dan ikut mengurangi terjadinya kelebihan besi tubuh. Djumpainya rasio hepsidin/feritin yang rendah pada kelompok hemokromatosis menandakan kurangnya respons tubuh terhadap adanya kelebihan besi. Penelitian mengenai pemberian hepsidin membuka peluang sebagai langkah preventif terjadinya kelebihan besi tubuh melalui hambatan peningkatan absorpsi besi enterosit. Hal tersebut mungkin akan membantu pencegahan dini terjadinya hemokromatosis pada penderita talasemia sehingga komplikasi yang ada dapat pula dicegah.

5.9.3. Prediksi kenaikan besi tubuh pada transfusi

Dari perhitungan persamaan antara saturasi transferin dan feritin terhadap jumlah darah yang diberikan, dapat dilakukan prediksi kenaikan saturasi dan feritin sesuai jumlah darah yang akan diberikan. Hal ini dapat digunakan oleh klinisi untuk memperhitungkan saat pemberian terapi kelasi untuk mencegah terjadinya kelebihan besi. Nilai batas prediksi untuk saturasi besi, feritin dan NTBI dapat digunakan untuk mendeteksi terjadinya hemokromatosis. Karena pemeriksaan

NTBI tersedia hanya terbatas menggunakan alat dan reagensia yang khusus, maka dibuat perhitungan prediksi untuk kadar NTBI berdasarkan kadar saturasi besi.

Berdasarkan perhitungan model untuk menilai rasio hepsidin feritin dapat diprediksi nilainya dari berbagai faktor yang dapat mempengaruhinya seperti kadar hemoglobin, jumlah besi serum, jumlah protein pengangkut besi di sirkulasi, jumlah darah yang diberikan dan jangka waktu lamanya telah mendapatkan transfusi serta jumlah besi bebas di sirkulasi perifer. Hal ini mungkin berguna kelak bila pemberian hepsidin digunakan sebagai terapi untuk mencegah masuknya besi berlebih melalui enterosit.

BAB VI

SIMPULAN DAN SARAN

6.1. SIMPULAN

Simpulan penelitian adalah sebagai berikut :

1. Aktivitas elastase pada kelompok penderita talasemia mayor dengan kelebihan besi secara bermakna lebih rendah jika dibandingkan dengan aktivitas elastase kelompok kontrol tanpa kelebihan besi. Proporsi penderita dengan elastase rendah berjumlah lebih banyak pada kelompok hemokromatosis. Hal ini sesuai dengan hipotesis pertama bahwa hemokromatosis akan mengakibatkan penurunan fungsi eksokrin dan endokrin pankreas. Hipotesis pertama terbukti.
2. Aktivitas laktase pada kelompok penderita talasemia mayor dengan kelebihan besi lebih rendah meskipun tidak bermakna jika dibandingkan dengan aktivitas laktase kelompok kontrol tanpa kelebihan besi. Hipotesis kedua mengenai penurunan laktase dan gangguan integritas usus akibat hemokromatosis tidak terbukti.
3. Ditemui adanya korelasi yang bermakna antara saturasi transferrin dengan elastase. Semakin tinggi konsentrasi saturasi transferrin semakin berat gangguan pankreas yang terjadi. Berdasarkan hal ini hipotesis ketiga mengenai adanya korelasi antara kadar saturasi transferrin dengan fungsi pankreas terbukti.
4. Tidak ditemui adanya korelasi yang bermakna antara saturasi transferrin dengan aktivitas laktase. Berdasarkan hal ini hipotesis ketiga mengenai adanya korelasi antara kadar saturasi transferrin dengan fungsi usus halus tidak terbukti.
5. Ditemui adanya korelasi yang bermakna antara kadar NTBI dengan elastase. Semakin tinggi konsentrasi NTBI semakin berat gangguan pankreas yang

- terjadi. Berdasarkan hal ini hipotesis keempat mengenai adanya korelasi antara kadar NTBI dengan fungsi pankreas terbukti.
6. Tidak dijumpai adanya korelasi yang bermakna antara kadar NTBI dengan elastase. Berdasarkan hal ini hipotesis ketiga mengenai adanya korelasi antara kadar NTBI dengan fungsi usus halus tidak terbukti.
 7. Ekspresi hepsidin sebagai rasio hepsidin/feritin secara bermakna lebih rendah pada kelompok penderita talasemia mayor dengan hemokromatosis jika dibandingkan dengan rasio hepsidin/feritin pada kelompok kontrol tanpa hemokromatosis. Terdapat korelasi negatif bermakna antara rasio hepsidin/feritin dengan parameter besi serum, saturasi transferin dan NTBI. Semakin rendah hepsidin semakin tinggi parameter besi serum, saturasi transferin dan NTBI. Berdasarkan hal ini, hipotesis kelima mengenai korelasi bermakna hepsidin dengan parameter besi lainnya terbukti.

6.2. TEMUAN TAMBAHAN

Di samping simpulan yang dikemukakan di atas, penelitian ini juga menyampaikan temuan lain di luar tujuan utama penelitian ini. Adapun temuan tersebut sebagai berikut :

1. Dijumpai adanya perbedaan bermakna aktivitas laktase antara kelompok subyek sehat dengan kelompok penderita talasemia dengan hemokromatosis dan kelompok talasemia tanpa hemokromatosis. Tidak dijumpai perbedaan bermakna antara aktivitas laktase kelompok dengan hemokromatosis dan tanpa hemokromatosis. Hal ini membuktikan bahwa pada talasemia telah terjadi gangguan pada enzim laktase usus halus.

2. Djumpa: adanya perbedaan bermakna ekskresi laktosa dan laktulosa pada kedua kelompok. Terdapat pula perbedaan bermakna untuk rasio laktosa/asupan dan ekskresi laktulosa/asupan antara kelompok subjek sehat dengan penderita talasemia dengan hemokromatosis dan penderita talasemia tanpa hemokromatosis. Hal ini membuktikan bahwa pada talasemia telah terjadi gangguan integritas usus halus.
3. Terdapat korelasi positif bermakna antara rasio hepsidin/feritin dengan clasiase dan laktulosa urin. Semakin tinggi rasio hepsidin semakin berat gangguan pankreas dan integritas usus halus yang terjadi.
4. Ekspresi hepsidin sebagai rasio hepsidin/feritin dipengaruhi oleh kadar hemoglobin, SI, TIBC, rasio jumlah darah yang ditransfusikan/ berat badan, rasio jumlah darah yang diberikan/bulan serta NTBI. Berdasarkan hal tersebut telah dibuat model persamaan untuk memprediksi ekspresi hepsidin.
5. NTBI merupakan komponen besi bebas bersifat toksik terhadap sel tubuh. NTBI meningkat secara bermakna pada penderita talasemia dengan hemokromatosis dibandingkan dengan kelompok talasemia tanpa hemokromatosis. Pada penderita talasemia dengan hemokromatosis terdapat lebih banyak besi bebas yang bersifat toksik terhadap organ tubuh. Telah dibuat persamaan untuk memprediksi kadar NTBI berdasarkan nilai saturasi transferin.
6. Beberapa parameter besi dapat digunakan sebagai prediktor adanya hemokromatosis, yaitu parameter saturasi transferin sebesar 55% (sensitivitas 98,1% dan spesifisitas 89,4 %), feritin 1145 ng/ml. (sensitivitas 91,8 % dan spesifisitas 89,4 %) dan NTBI 2,43 U/l/ml. (sensitivitas 91,2 % dan spesifisitas 96,4 %).

6.3. SARAN

Beberapa hal berikut merupakan saran penelitian ini :

1. Sebagai tindak lanjut penelitian ini, perlu dilakukan uji klinik mengenai manfaat pemberian preparat enzim pankreas pada penderita talasemia untuk memperbaiki tumbuh kembang.
2. Karena prevalensi tipe dewasa masih tinggi di Indonesia, untuk mendeteksi adanya gangguan fungsi usus halus mungkin lebih baik digunakan parameter bukan laktosa, misalnya sukrosa atau maltosa.
3. Proses digesti di usus halus membutuhkan berbagai jenis enzim. Perlu dilakukan uji klinis mengenai manfaat pemberian berbagai enzim tersebut pada penderita talasemia untuk memperbaiki tumbuh kembang.
4. Penderita talasemia mempunyai gangguan pada *tight junction* enterosit, terlihat dari ekskresi laktulosa yang lebih tinggi dibandingkan kelompok subyek sehat. Perlu diteliti adanya gangguan pada integritas usus halus dengan petanda lain.
5. Tingginya kadar hepsidin pada penderita talasemia perlu dipelajari lebih lanjut hubungannya dengan proses infeksi dan inflamasi.

RINGKASAN

PENDAHULUAN

Talasemia adalah suatu kelainan bawaan yang ditandai dengan gangguan sintesis hemoglobin akibat berkurang atau hilangnya pembentukan satu atau lebih rantai globin. Talasemia merupakan kelainan genetik yang paling sering dijumpai di seluruh dunia, juga di Asia Tenggara termasuk Indonesia. Pada talasemia β mayor terjadi gangguan pembentukan rantai β globin yang menyebabkan terdapatnya kelebihan rantai α globin yang mempercepat terjadinya apoptosis dan destruksi eritrosit di sumsum tulang dan darah tepi. Terjadi eritropoiesis yang tidak efektif, percepatan siklus daur ulang besi dan anemia berat serta peningkatan absorpsi besi di usus dan terjadi kelebihan besi tubuh. Pemberian transfusi darah berkala akan lebih mempercepat terjadinya kelebihan muatan besi sehingga menimbulkan hemokromatosis sekunder. Terjadi peningkatan besi bebas dalam plasma sebagai *non transferrin bound iron* (NTBI), pengendapan besi pada berbagai organ, seperti hati, pankreas, jantung, dan saluran cerna dan perubahan fungsi serta kerusakan pada organ tersebut.

Pada pankreas terjadi gangguan penurunan fungsinya sebagai kelenjar endokrin dengan manifestasinya sebagai diabetes melitus, dan pada fungsi eksokrin yang akan tampak sebagai gangguan digesti nutrisi di usus. Laktase merupakan salah satu enzim disakaridase yang terletak di bagian apikal mikrovilus. Gangguan pada integritas usus dapat menyebabkan berkurangnya produksi laktase. Pada talasemia sering terjadi gangguan pertumbuhan antara lain akibat kurangnya nutrisi yang masuk.

Akhir-akhir ini banyak diteliti peran hepsidin, suatu hormon peptida yang dibentuk di hati dan berfungsi sebagai regulator negatif absorpsi besi di enterosit. Ekspresi hepsidin akan dipengaruhi oleh besarnya cadangan besi tubuh dan aktivitas eritropoiesis. Hepsidin meningkat pada keadaan kelebihan besi tubuh, akan menurun pada eritropoiesis yang meningkat. Hepsidin kini juga dikembangkan sebagai terapi dalam upaya mencegah absorpsi besi berlebih pada talasemia mayor.

Hingga saat ini belum dijumpai di telaah pustaka mengenai efek hemokromatosis pada saluran cerna secara menyeluruh (usus, pankreas dan hati) pada penderita talasemia. Bila dijumpai gangguan fungsi usus dan pankreas, pemberian enzim akan meningkatkan kemampuan pencernaan dan penyerapan nutrisi sehingga akan memperbaiki status pertumbuhan penderita talasemia. Atas dasar ini ingin diteliti apakah kelebihan besi pada talasemia mengakibatkan gangguan fungsi eksokrin pankreas yang dinilai dari aktivitas elastase E-1 dan gangguan integritas serta fungsi vili halus yang dinilai dari aktivitas laktase yang dinyatakan dengan rasio laktosa laktulosa. Akan dianalisis apakah manifestasi gangguan fungsi saluran cerna yang terjadi mempunyai korelasi dengan saturasi transferin dan NTBI. Selain itu juga diteliti ekspresi hepsidin, korelasinya dengan kelebihan besi dan eritropoiesis yang aktif.

BAHAN DAN CARA KERJA

Penelitian ini dilakukan dengan desain studi *cross sectional*, di Departemen Ilmu Kesehatan Anak, Patologi Klinik FKUI-RSCM, Lembaga Biologi Molekuler Eijkman Jakarta dan Eijkman-Winkler Center, University Medical Center, Utrecht serta Departemen Farmasi UI. Subyek penelitian ini adalah penderita talasemia β -mayor dengan hemokromatosis dan tanpa hemokromatosis sebagai kelompok

kontrol. Dilakukan penelitian pendahuluan dengan 20 subyek sehat untuk mendapatkan nilai rujukan laktase.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Sejumlah 108 penderita talasemia dengan hemokromatosis, rentang usia 1,3-23 tahun (rerata 8,1 tahun) dan 86 penderita talasemia tanpa hemokromatosis, rentang usia 2-49 tahun (median 32,0 tahun) menjadi subyek pada penelitian ini. Penderita hemokromatosis telah mendapat transfusi dengan rerata 46,3 bulan, dengan median jumlah darah yang ditransfusikan sebanyak 22,063 mL. Dari perhitungan status gizi pada kelompok talasemia dengan hemokromatosis didapatkan 52,8% (57/108) mempunyai tinggi badan kurang (z score $< -2,0$), 34,3% (37/108) dengan berat badan kurang dan 5,6% (6/108) mengalami kekurangan gizi (*wafer*), terdapat perbedaan BMI dengan kelompok kontrol yang berbeda bermakna ($p=0,000$). Untuk pemeriksaan parameter laboratorium penunjang berupa SGOT, SGPT, albumin, kreatinin, glukosa sewaktu dijumpai adanya perbedaan yang bermakna dibandingkan kelompok kontrol.

Pada kelompok talasemia dengan hemokromatosis didapatkan penurunan fungsi ekskresi pankreas yang dilihat dari aktivitas elastase E-1 yang lebih rendah secara bermakna. Dijumpai proporsi insufisiensi pankreas pada 55,9% penderita hemokromatosis, sedangkan pada kelompok kontrol didapatkan proporsi sebesar 14,7%. Pada kelompok dengan hemokromatosis didapatkan aktivitas laktase yang lebih rendah tapi tak bermakna, proporsi laktase yang abnormal terdapat pada 12,2% subyek, sedangkan pada kelompok kontrol didapatkan proporsi abnormal sebesar 10%. Perbedaan ini tidak bermakna secara statistik ($p > 0,05$). Dari perbandingan laktase dan ekskresi laktulosa antara kelompok sehat, hemokromatosis

dan talasemia tanpa hemokromatosis dijumpai adanya penurunan laktase dan gangguan integritas yang bermakna pada kelompok talasemia baik dengan atau tanpa hemokromatosis ($p < 0,05$). Dijumpai adanya korelasi negatif antara saturasi transferin terhadap elastase E-1 pankreas ($r = -0,478$; $p = 0,000$), dan antara NTBI dengan elastase 1 pankreas ($r = -0,427$; $p = 0,000$). Hanya terdapat korelasi lemah antara ekskresi laktosa dengan saturasi transferin ($r = -0,189$; $p = 0,018$). Semakin tinggi saturasi dan NTBI semakin terganggu fungsi pankreas dan integritas usus.

Untuk parameter besi dijumpai peningkatan yang bermakna ($p < 0,05$) untuk parameter saturasi transferin, ferritin, NTBI dan rasio hepsidin/ferritin pada kelompok talasemia dengan hemokromatosis. Kadar hepsidin lebih tinggi pada kelompok hemokromatosis tetapi secara statistik tak bermakna. Ekspresi hepsidin sebagai rasio hepsidin/ferritin pada kelompok talasemia dengan hemokromatosis jauh lebih rendah dibandingkan kelompok kontrol. Nilai tersebut berbeda bermakna secara statistik ($p=0,000$). Hal ini membuktikan adanya gangguan pada hepsidin sehingga tidak dapat mengimbangi adanya peningkatan cadangan besi tubuh yang terlalu meningkat. Didapatkan nilai cut off untuk prediktor adanya hemokromatosis, yaitu saturasi transferin 55% (sensitivitas 99,1% dan spesifisitas 89,4%); ferritin 1145 ng/mL (sensitivitas 91,0% dan spesifisitas 89,4%) dan NTBI 2,43 μ U/mL (sensitivitas 93,2 % dan spesifisitas 96,4 %). Pada penelitian ini didapatkan korelasi saturasi transferin terhadap NTBI mempunyai $r = 0,9296$ ($p < 0,050$), dengan persamaan garis $y = 0,0643x - 0,9089$. Persamaan ini dapat digunakan untuk memprediksi banyaknya besi bebas NTBI yang ada di sirkulasi berdasarkan pemeriksaan saturasi transferin.

Dapat terlihat adanya korelasi negatif yang bermakna antara rasio hepsidin/feritin dengan besi serum, saturasi transferin dan NTBI. Semakin tinggi hepsidin, semakin rendah besi serum, saturasi transferin serta NTBI. Dijumpai korelasi negatif hepsidin dengan aktivitas eritropoiesis yang dinyatakan dengan retikuloosit, IRF serta HFR. Semakin tinggi aktivitas eritropoiesis semakin rendah rasio hepsidin/feritin. Rasio dari ekspresi hepsidin yang dihitung sebagai rasio hepsidin/feritin dipengaruhi oleh beberapa faktor lain sesuai dengan model sebagai berikut: $\text{Log hepsidin/feritin} = -1,126 - 0,095 \text{ Hb} - 0,007 \text{ SI} + 0,009 \text{ TIBC} + 0,785 \text{ log CC/BB} - 0,368 \text{ log CC/Bln} - 0,065 \text{ NTBI}$.

Dijumpai korelasi positif lemah antara jumlah relatif neutrofil dengan rasio hepsidin/feritin ($p < 0,050$). Semakin tinggi neutrofil, semakin meningkat rasio hepsidin/feritin. Terdapat korelasi yang positif antara saturasi transferin, feritin dan NTBI terhadap banyaknya darah yang ditransfusikan serta banyaknya darah per kg berat badan yang diberikan. Semakin banyak jumlah darah yang ditransfusikan semakin tinggi nilai saturasi transferin, feritin dan NTBI. Juga terdapat korelasi yang negatif antara rasio hepsidin/feritin terhadap banyaknya darah yang diberikan dan rasio jumlah darah dengan lamanya transfusi. Semakin banyak darah yang diberikan, semakin rendah rasio hepsidin/feritin.

SIMPULAN DAN SARAN

Dari penelitian ini dapat disimpulkan bahwa pada penderita talasemia dengan hemokromatosis terjadi insufisiensi eksokrin pankreas. Penderita talasemia baik dengan atau tanpa hemokromatosis memperlihatkan adanya penurunan aktivitas enzim laktase dan perubahan integritas usus halus bila dibandingkan dengan kelompok subyek sehat. Ekspresi hepsidin sebagai rasio hepsidin/feritin

secara bermakna lebih rendah pada kelompok penderita talasemia dengan hemokromatosis, tidak sesuai dengan keadaan kelebihan besi tubuh yang terjadi.

Sebagai tindak lanjut penelitian ini, perlu dilakukan uji klinis mengenai manfaat pemberian preparat enzim pankreas dan usus halus pada penderita talasemia untuk memperbaiki tumbuh kembang. Untuk mendeteksi adanya gangguan fungsi dan integritas usus mungkin disarankan untuk menggunakan parameter lain seperti mikrosa, maltosa serta xilosa. Perlu di perlu dipelajari lebih lanjut hubungan hepsidin dengan proses infeksi dan inflamasi.

SUMMARY

INTRODUCTION

Thalassemia is a hereditary disorder, characterized by a defect in hemoglobin synthesis due to deficiency in one or more globin chains. Thalassemia the most commonest genetic disorder can be found worldwide, including in Southeast Asia and Indonesia. In β thalassemia major, impairment in the production of the β globin chain will cause imbalance, a globin chain excess which results in apoptosis and erythrocyte destruction in marrow and circulation. The ineffective erythropoiesis results in severe anemia and increase iron absorption through the enterocytes and cause secondary hemochromatosis. Repeated blood transfusion will aggravate the iron overload condition. There is increase of *non transferrin bound iron* (NTBI) and iron deposition in body organs, such as in the liver, pancreas, heart and gastrointestinal tract which causes functional impairment and organ damage.

There is impairment in the function of pancreas as an endocrine organ, and cause diabetes mellitus. Impairment in the exocrine function manifested as impairment of nutrient digestion in the gut. Lactase is one of the disaccharides enzymes produced in the apical part of the microvillus of brush border. Abnormalities in the intestinal integrity will decrease lactase production. Growth disturbances can often be observed in thalassemia patients due to decreased nutrient absorption.

Recently, hepcidin, a small peptide hormone, has been found as a negative regulator for iron absorption in the enterocytes. Hepcidin expression is regulated by the body iron stores and erythropoiesis activity. Hepcidin expression increased in

iron overload, and decreased in anemia and increased erythropoiesis activity. Hepcidin is currently being developed as therapy for the prevention of increase iron efflux through erythrocytes in thalassemia major.

Currently, no study has been conducted to evaluate the overall effect of hemosiderosis on the gastrointestinal system (intestine, pancreas and liver) in thalassemia subjects. Enzyme supplementation will be beneficial for the improvement of the digestion and absorption process if there are impairment of the pancreas and intestine function, and will improve the growth of the patients.

MATERIAL AND METHODS

Based on that, the aim of this study is to analyze the effect of hemosiderosis in thalassemia whether it will cause impairment of the exocrine pancreatic function evaluated as the elastase E-1 pancreas activity; to analyze the impairment of intestinal function evaluated as lactase activity calculated as ratio of lactase/lactulose; to analyze the correlations between transferrin saturation and NTBI to elastase and lactase activity, and the expression of hepcidin will be evaluated in correlation with iron overload and increase erythropoiesis.

RESULTS AND DISCUSSION

This study was conducted in the Department of Child Health, Clinical Pathology Faculty of Medicine University of Indonesia – Cipto Mangunkusumo Hospital, Eijkman Institute for Molecular Biology Jakarta, Eijkman-Winkler Center, University Medical Center, Utrecht, Faculty of Pharmacy University of Indonesia as a cross sectional study. The subjects consisted of thalassemia patients with hemosiderosis group and thalassemia without hemosiderosis as the

control group. A preliminary study was performed with 20 healthy subjects to obtain the reference values for lactase activity.

The hemochromatosis group consisted of 108 subjects aged 12 – 23 years old (mean 8.1) and the non hemochromatosis group consisted of 86 subjects age 2 – 49 years old (median 32). The hemochromatosis subjects have received blood transfusion for 46.3 months, with total 22,063 mL of blood. In the thalassemia with hemochromatosis group there were 52.8% (57/108) subjects with low body height (z score < -2.0), 34.3% (37/108) with low body weight and 5.6% (6/108) with under nutrition. There was significant difference for the BMI values as compared to non hemochromatosis group ($p=0.000$). There were significant difference for ALT, AST, albumin, creatinin, glucose compared with the control group.

Impairment of pancreatic function was found in the hemochromatosis group as calculated by the elastase E-1 activity. The proportion of pancreatic insufficiency was 55.9% as compared to 14.7% in the control group. Lower lactase activity was observed in the hemochromatosis group, but not significantly different. The abnormal lactase activity was found in 12.2% hemochromatosis subjects and 10% in the control group. In comparison to the healthy control group, a significantly lower lactase activity and impairment in the intestinal integrity was observed ($p < 0.05$). There is negative correlation between transferrin saturation to elastase E-1 ($r = -0.478$; $p = 0.000$), and between NTBI to elastase E-1 pancreas ($r = -0.427$; $p = 0.000$). Only weak correlation was found for lactulose excretion and transferrin saturation ($r = -0.189$; $p = 0.018$). Increase of transferrin saturation or NTBI will cause more impairment.

Negative correlation was observed between hepcidin/ferritin ratio to serum iron, transferrin saturation and NTBI. Increase in hepcidin will cause low serum iron, transferrin saturation and NTBI. Negative correlation was found between hepcidin with erythropoiesis activity calculated with reticulocytes, IRF and HFR. High erythropoiesis activity will diminish the hepcidin as hepcidin/ferritin ratio. Hepcidin ratio is influenced by several factors as expressed in this following model:
$$\text{Log hepcidin/ferritin} = -1.125 - 0.095 \text{ Hb} - 0.007 \text{ SI} + 0.009 \text{ TIBC} + 0.785 \log \text{CC/BB} - 0.368 \log \text{CC/Blr} - 0.065 \text{ NTBI}$$

A positive significant correlation was found between hepcidin/ferritin ratio to neutrophils ($p < 0.050$). Increase in neutrophils will cause increase in the hepcidin/ferritin ratio. Positive correlations were found between transferrin saturation, ferritin and NTBI to the amount of transfused blood and the ratio of total blood/ kg body weight. More transfusion will cause increase in transferrin saturation, ferritin and NTBI. Negative correlation was found between hepcidin/ferritin ratio to the amount of blood transfused and length of transfusion. More blood transfused will decrease the hepcidin/ferritin ratio.

CONCLUSION AND SUGGESTION

Based on the above findings, exocrine pancreatic impairment was found in the thalassemia subjects with hemochromatosis. Thalassemia subjects with or without hemochromatosis showed a decrease in the lactase activity and impairment of the intestinal integrity compared to the healthy subjects. Hepcidin expression as hepcidin/ferritin ratio was significantly lower in the thalassemia with hemochromatosis, although the iron overload condition, inappropriate to the high body iron concentration.

Following this study, it is recommended that clinical study should be performed on the benefit of pancreatic and small intestines enzymes supplementation to improve the growth in thalassemic children. To detect the intestinal function and integrity it is recommended to use other parameter, such as sucrose, maltose and xylose. The correlation of hepcidin/ferritin ratio to infection and inflammation should also be studied.

DAFTAR PUSTAKA

1. Weatherall DJ. Fortnightly review : The thalassaemias. *Br Med J*. 1997; 314: 1675-9.
2. Pignatti CB, Galanello R. Thalassaemias and related disorders: Quantitative disorders of hemoglobin synthesis. In: Greer JP, Foerster J, Lukens JN, Rodgers GM, Paraskevas F, Glader B eds. *Wintrobe's Clinical hematology*. 11th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2004. p. 1319-52.
3. McKenszie SB. *Textbook of Hematology*. 2nd ed. Philadelphia: Williams and Wilkins; 1996. p. 123-78.
4. Lié-Injo LE, Kho LK, Liem DL, Oei OB. Further cases of Cooley's anemia in Indonesia. *Acta Hematol*. 1959; 21: 102-8.
5. Wahidiyat I. Penelitian thalassaemia di Jakarta. Tesis. Jakarta: Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, 1979.
6. Setianingsih I. β thalassaemia in Indonesia : Molecular basis and phenotype-genotype correction. Tesis. Melbourne : The Murdoch Institute, University of Melbourne, Australia, 2000;
7. Sofro ASM. Molecular pathology of β thalassaemia in Indonesia. *South east J Trop Med Public Health*. 1995; 26: 5-8.
8. Clarke GM, Higgins TN. Laboratory investigation of hemoglobinopathies and thalassaemias : review and update. *Clin Chem*. 2000; 46: 1284-90.
9. Williams JL. Anemias of abnormal globin development- thalassaemias. In : Martin EAS, Steininger CAL, Koepke JA, editors. *Clinical Hematology: Principles, procedures, correlations*. 2nd eds. Philadelphia : Lippincott-Raven; 1998. p. 217-51.
10. Olivieri NF, Brittenham GM. Iron-chelating therapy and the treatment of thalassaemia. *Blood*. 1997; 89(3): 739-61.
11. Herakho C, Link G, Cahantchik I. Pathophysiology of iron overload. *Ann NY Acad Sci*. 1998; 850: 191-201.
12. Beutler E, Hoffbrand V, Cook JD. Iron deficiency and overload. *Hematology*. 2003; 40-61.

13. Cunningham MJ, Macklin EA, Neufeld EJ, Cohen AR. Complication of thalassemia major in North America. *Blood*. 2004; 104: 34-9.
14. Balduz WP, Bhatti KP, Brandtzen DJ. In: Barton JC, Edwards CQ eds. Hemochromatosis. Genetics, pathophysiology, diagnosis and treatment. 1st ed. Cambridge : Cambridge University Press; 2000. p. 187-99.
15. Marc LM, Hider RC. Iron: an essential but potentially harmful nutrient. *Eur J Clin Invest*. 2002; 32(s): 1-2.
16. Andrews NC, Greer JP, Forster J, et al. Iron deficiency and related disorders. In : Greer JP, Forster J, Lukens JN, Rodgers GM, Paraskevas F, Glader B, eds. *Wintrobe's Clinical hematology* 11th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins ; 2004. p. 979-1009.
17. Courtois F, Garofalo SC, Ledoux M, Seidman E, Levy E. Iron-ascorbate alters the efficiency of iaco-2 cells to assemble and secrete lipoproteins. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2000; 27: 912-9.
18. Sherwood L. *Human Physiology. From cells to system*. 1st ed. Belmont: Thomson Brooks/Cole; 2004. p. 590-645.
19. Wylie R. Normal development, structure and function; stomach and intestines. In : Behrman RE, Kliegman RM, Jenson HB, eds. *Nelson textbook of Pediatrics*. 17th ed. Philadelphia : Saunders ; 2004. p. 1228-32.
20. Roy CN, Enas CA. Iron homeostasis : new tales from the crypt. *Blood*. 2000; 96: 4020-7.
21. Ferraris RP. Dietary and developmental regulation of intestinal sugar transport. *Biochem J*. 2001; 360: 265-76.
22. Akompong T, Rasmussen E, Chang C, Yu ZK, Resnick MW. Immunological analysis of β thalassemic mouse intestinal proteins reveals up-regulation of sucrase-isomaltase in response to iron overload. *J Nutr*. 1999; 129: 949-52.
23. Ezra JK, Zibis A, Chaiaros N, Hatzikonstantinou I, Karantanas A. Body composition in homozygous β thalassemia. *Ann NY Acad Sci*. 2000; 904: 621-4.
24. Fuchs GJ, Tienboon P, Khaled MA, et al. Nutritional support and growth in thalassemia major. *Arch Dis Child*. 1997; 76: 509-12.
25. Low LC. Growth of children with β -thalassemia major. *Indian J Pediatr*. 2005; 72: 159-64.

26. Schappi MG, Smith VV, Cubitt D, Milla PJ, Lindley KJ. Faecal elastase 1 concentration is a marker of duodenal enteropathy. *Arch Dis Child*. 2002; 86: 50-3.
27. Fernandes MIM, Galvao LC, Bertolozzi MF, Oliveira WP, Zacolotto S, Bianchi MLP. Disaccharidase levels in normal epithelium of the small intestine of rats with iron deficiency anemia. *Braz J Med Biol Res*. 1997; 30: 549-54.
28. Dharmasetiawani N, Suryadi H, Firmansyah A. Quantitative analysis of lactose and lactulose in urine by high performance liquid chromatography for determination of intestinal lactase activity. *Med J Indon*. 2003; 12: 8-12.
29. Hershko C, Ronson A, Souroujon M, Cabantchick IZ, Patz J. Mechanism of iron regulation and of iron deficiency. *Hematology*. 2007; 1: 1-8.
30. Camaschella C, Pagani A, Poggiali E, Silvestri L. Screening hemochromatosis and iron overload. *Hematology*. 2007; 1: 18-23.
31. Pietrangello A. Hereditary hemochromatosis. *Annu Rev Nutr*. 2006; 25: 1-70.
32. Andrews NC, Schmidt PJ. Iron homeostasis. *Annu Rev Physiol*. 2007; 69: 69-85.
33. Cheu ST, Weiss MJ. Diseases red blood cells topple iron balance. *Nat Med*. 2007; 9: 1096-101.
34. Miller JL, Tanno T. GDF a marker and cause of morbidity in thalassemia. Diunduh dari: URL: <http://techdev.nidck.nih.gov/thalassemia.shtml>. Diakses 23 Mei 2007.
35. Camaschella C. Understanding iron homeostasis through genetic analysis of hemochromatosis and related disorders. *Blood*. 2005; 106: 3710-7.
36. Trinder D, Fox C, Vautier G, Olynyk JK. Molecular pathogenesis of iron overload. *Gut*. 2002; 51: 290-5.
37. Cabantchik, Ioav Z. The cellular regulation of iron in health and disease. 2003. Diunduh dari: URL: <http://biochem.tpi.ac.il/cabantchik.org/home/cabantchik>. Diakses 12 Desember 2005.
38. Pietrangelo A, Trautwein C. Mechanism of disease : the role of hepcidin in iron homeostasis – implication for hemochromatosis and other disorders. *Nature*. 2004; 1: 39-45.

39. Ganz T. Hepsidin, a key regulator of iron metabolism and mediator of anemia of inflammation. *Blood*. 2003; 102(3): 7E3-8.
40. Gibbons R, Higgs DR, Olivieri NF, Wood WG. Clinical features of the thalassemias. In : Weatherall DJ, Clegg JB, eds. *The Thalassemia Syndromes*. 4th ed. Oxford: Blackwell Science. 2001. p. 287-594.
41. Olivieri NF. The β thalassemia. *N Eng J Med*. 1999; 11: 99-109.
42. Gure C. Hemoglobinopathies. 2004. Diunduh dari: URL: <http://www.carolgure.com/text/442-11-clinicalgenetics.shtml>. Diakses 21 September 2005.
43. Browne PV, Shaley D, Kuypers FA, Heugnot C, Solovey A, Mohandas N, et al. Membrane iron in vivo ameliorates the pathobiology of murine thalassemia. *Am Soc Clin Invest*. 1997; 100: 1459-64.
44. Sunbaccananda A, Malalit P, Tanphachir VS, Pattanakitsakul S, et al. Renal tubular function in β thalassemia. *Pediatr Nephrol*. 1998; 12: 280-3.
45. Kushner JP, Prier JP, Olivieri NF. Secondary iron overload. *Hematology: American Society of Hematology. Education Program Handbook*, 2001.
46. Weaver LT. Anatomy and embryology. In : Walker WA, Durie PR, Hamilton JR, Walker-Smith JA, Watkins JB, eds. *Pediatric Gastrointestinal Disease Vol 1*. 1st ed. Ontario : BC Decker Inc; 1991. p. 195-216.
47. Schmitz I. Malabsorption. In : Walker WA, Durie PR, Hamilton JR, Walker-Smith JA, Watkins JB, eds. *Pediatric gastrointestinal disease vol 1*. 1st ed. Ontario : BC Decker Inc; 1991. p. 79-89.
48. Allison G. Ontogeny of small intestinal function. 2004. Diunduh dari: URL: <http://dwb.unl.edu/Teacher/NSF/C10/C10Linka/arb1.evmsb.colostate.edu/ibooks/pathophys/digestion/smallgut/ontogeny.html>. Diakses 5 May 2005.
49. Auricchio S, Walker WA, Durie PR, Hamilton JR, Walker-Smith JA, Watkins JB. Genetically determined disaccharidase deficiencies. 1st ed. Ontario : BC Decker Inc; 1991. p. 647-67.
50. Catherers JM, Henderson JM. Malabsorption. *Gastrointestinal pathophysiology*. Philadelphia : Lippincott-Raven; 1996. p. 111-52.

51. Crab TLB, Gregg JP, Rivera FA, Choi RS, Diamond JM, Fonkalsrud EW. Delayed disaccharidase development in a rabbit model of intrauterine growth retardation. *Pediat Res*. 2001; 50: 520-4.
52. Peuhkuri K. Lactose, lactase, and bowel disorders; reducing hypolactasia-related gastrointestinal symptoms by improving the digestibility of lactose. Academic Dissertation, University of Helsinki, Institute of Biomedicine, Department of Pharmacology and Toxicology, Faculty of Medicine. Helsingin yliopiston verkkojulkaisu. 2000. (ISBN 951-45-9177-1). Diunduh dari URL: <http://ethesis.helsinki.fi/julkaisot/ian/biolo/vk/peuhkuri/chap2.html>. Diakses 8 April 2005.
53. Nam HY, Lacey SW, Sambrook JF, Gething MH. Expression of a full-length cDNA coding for human intestinal lactase-phlorizin hydrolase reveals an uncleaved, enzymetically active, and transport-competent protein. *J Bio Chem*. 1991; 19: 12313-20.
54. Nam HY, Zimmer P. Congenital disease of dysfunction and absorption: Genetically determined disaccharidase deficiency. In: Walker WA, Goulet OJ, Kleinmann RE, Saniberson IR, Sherman PM, Shneider BL, editors. *Walker's Pediatric Gastrointestinal Disease: Pathophysiology, Diagnosis, Management*. 4th ed. Hamilton, Ontario: BC Decker Publisher Inc; 2005(in press). p. 880-97.
55. Ghishan FK. In : Walker WA, Durie PR, Hamilton JR, Walker-Smith JA, Watkins JB, *Secondary enzyme deficiencies ; pediatric gastrointestinal disease*. 1st ed. Ontario : BC Decker Inc; 1991. p. 728-32.
56. Kolho KL, Savilabti E. Ethnic differences in intestinal disaccharidase values in children in Finland. *J Pediat Gastroenterol Nutr*. 2000; 30(3): 283-7.
57. Graud RJ, Montgomery RK, Chitkara DK, Hirschhorn JN. Changing genes; losing lactase. *Gut*. 2003; 52: 617-9.
58. Lee MF, Russell MR, Montgomery RK, Krasinski SD. Total intestinal lactase and sucrase activities are reduced in aged rats. *J Nutr*. 1997; 127: 1382-7.
59. Storch EE, Lottaz D. Intestinal brush-border membrane hydrolases. 2005. Diunduh dari URL: <http://rthbiomol.unibe.ch/storch.html>. Diakses 2 Agustus 2006.

60. Hentze MW, Mucke-Maler M, Andrews NC. Balancing Acts. Molecular control of mammalian iron metabolism. *Cell*. 2004; 117: 285-97.
61. Cairo G, Pietrangeli A. Iron regulatory proteins in pathobiology. *Biochem J*. 2000; 352: 341-50.
62. Conrad ME, Umhau JN, Moore EG, Pannley RT. Intestinal iron absorption and hemochromatosis. In : Barton JC, Edwards CQ, eds. Hemochromatosis: Genetics, pathophysiology, diagnosis and treatment. 1st ed. Cambridge UK : Cambridge University Press; 2000. p.118-30.
63. Park CH, Valore EV, Waring AJ, Ganz T. Hepsidin, a urinary antimicrobial peptide synthesized in the liver. *J Biol Chem*. 2001; 276: 7806-10.
64. Kulaksiz H, Gebike SG, Juretko A, et al. Pro-hepsidin : expression and cell specific localisation in the liver and its regulation in hereditary haemochromatosis, chronic renal insufficiency, and renal anaemia. *Gut*. 2004; 53: 735-43.
65. Walker AP, Partridge J, Sni SK, Donley JS. Hepsidin: what every gastroenterologist should know. *Gut*. 2004; 53: 624-7.
66. Nicolas G, Bennoun M, Devaux I, Beaumont C, Grandchamp B, Kahn A, et al. Lack of hepsidin gene expression and severe tissue iron overload in upstream stimulatory factor 2 (*USF2*) knockout mice. *PNAS*. 2001; 98: 8780-5.
67. Ganz T, Nemeth E. Iron importa. IV. Hepsidin and regulation of body iron metabolism. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2006; 290: G199-G203.
68. Robson KJ. Hepsidin and its role in iron absorption. *Gut*. 2004; 53: 617-9.
69. Pigeon C, Lhyn G, Coursaud B, et al. A new mouse liver-specific gene, encoding a protein homologous to human antimicrobial hepsidin, is overexpressed during iron overload. *J Biol Chem*. 2001; 276: 7811-9.
70. Domenico ID, Ward DM, Kaplan J. hepsidin regulation : ironing out the details. *J Clin Invest*. 2007; 117: 1755-8.
71. Papanikolaou G, Tzifanos M, Christakis II, Bogdanos D, Tsimirika K, MacFarlane, et al. Hepsidin in iron overload disorders. *Blood*. 2005; 106: 4103-5.
72. Barton JC. A brief history of hemochromatosis. In : Barton JC, Edwards CQ, editors. Hemochromatosis: Genetics, pathophysiology, diagnosis and treatment. 1st ed. Cambridge UK : Cambridge University Press; 2000. p. 3-7.

73. Fairbanks VE. Hemochromatosis: population genetics. In: Barton JC, Edwards CQ, eds. Hemochromatosis. Genetics, pathophysiology, diagnosis and treatment. 1st ed. Cambridge UK :Cambridge University Press; 2000. p. 42-50.
74. Fargion S, Sampietro M, Cappellini MD. Hemochromatosis. In : Barton JC, Edwards CQ, eds. Hemochromatosis. Genetics, pathophysiology, diagnosis and treatment. 1st ed. Cambridge UK : Cambridge University Press; 2000. p. 435-41.
75. Edwards CQ, Greer JP, Foerster J, et al. Hemochromatosis, In : Greer JP, Foerster J, Lukens JN, Rodgers GM, Paraskevas F, Glader B, eds. Winrobe's Clinical hematology 11th ed, Philadelphia : Lippincott Williams & Wilkins; 2004. p. 1036-55.
76. Nemeth E, Ganz T. Regulation of iron metabolism by hepcidin. *Annu Rev Nutr.* 2006; 323-42.
77. Whitecomb DC. Mechanism of disease: advances in understanding the mechanisms leading to chronic pancreatitis. *Nature Clin Pract Gast Hep.* 2004; 1: 46-52.
78. Campeotto F, Kapel N, Kalach N, et al. Low levels of pancreatic elastase 1 in stools of preterm infants. *Arch Dis Child Fetal Neonat Ed.* 2002; 86: F198-F199
79. Lembar S. Kadar elastase pancreas 1 tinja sebagai petanda gangguan fungsi eksokrin pancreas pada penderita talasemia beta mayor. Tesis. Bagian Patologi Klinik FKUI, 2001.
80. Anonym. Manual book of Pancreatic Stool Elastase 1. 2006.
81. Anonym. Manual book of Sysmex XT2000i. Sysmex, Japan. 2006.
82. Anonym. Leaflet Serum iron. Dade Behring. Germany. 2006.
83. Anonym. Leaflet Montrol Control Sera. Hitachi. Germany. 2006.
84. Anonym. Leaflet Total iron binding capacity. Dade Behring. Germany. 2006.
85. Anonym. Leaflet Ferritin. Roche. USA. 2006
86. Breuer W, Ronson A, Slotki IN, Abramov A, Herzko C, Cabantchick ZI. The assessment of serum nontransferrin-bound iron in chelation therapy and iron supplementation. *Blood.* 2000; 95: 2975-82.
87. Anonym. Leaflet Hepcidin. DRG, Germany. 2006.

88. Anonym. Leaflet SGOT. Hitachi. Germany. 2006
89. Anonym. Leaflet SGPT. Hitachi. Germany. 2006
90. Anonym. Leaflet Albumin. Hitachi. Germany. 2006
91. Anonym. Leaflet Precinorm U & Precipath. Hitachi. 2006.
92. Anonym. Leaflet Ureum. Hitachi. Germany. 2006
93. Anonym. Leaflet Creatinin. Hitachi. Germany. 2006
94. Anonym. Data nilai rujukan laboratorium RSCM. 2007.
95. Takeshita K. Takeshita K. Thalassemia beta. E medicine. 2007. Diunduh dari:
URL: <http://www.Emedicine.com/mod/topic2260.htm>. Diakses: 20 September 2007.
96. Moeslichan SMZ. Transfusi darah tepat guna. Dalam Wahidiyat I, Gatot D, Mangaratmadja I. Naskah lengkap pendidikan tambuhan berkala ilmu kesehatan anak ke XXIV. Perkembangan terakhir penyakit hematology onkologi anak. Jakarta. Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, 1991.p.109-18.
97. Cohen AR, Galanello R, Perrelli DJ, Cunningham MI, Vichinsky E. Thalassemia. *Hematology*. 2004;11 :14-34.
98. Timan IS, Latu J, Aulia D, Moeslichan S. Hepatitis C among blood donors in Jakarta. *Southeast As J Trop Med Publ Health*. 1993; 24 (Suppl): 278-9.
99. Schneider A, Fank B, Caspary, Stein J. Monoclonal versus polyclonal ELISA for assessment of fecal elastase concentration : pitfalls of a new assay. *Clin Chem*. 2005; 51: 1052-4.
100. Kori M, Metzger AM, Shamir R, Sirota L, Dinari G. Fecal elastase I levels in premature and full term infants. *Arch Dis Child*. 2003; 88: F 106-10.
101. Cavalot F, Bonanno K, Perna P, et al. Pancreatic elastase I in stool, a marker of exocrine pancreas function, correlates with both residual b cell secretion and metabolic control in type 1 diabetic subjects. *Diab Care*. 2004; 27: 2052-4.
102. Miki K, Butler R, Moore D, Davidson G. Rapid and simultaneous quantification of rhamnose, mannitol and lactulose in urine by HPLC for estimating intestinal permeability in pediatric practice. *Clin Chem*. 1996; 42: 71-3.
103. Bernotti S, Seidman E, Simeet D, Brunet S, Dionne S, Delvin E, et al. Inflammatory reaction without exogenous antioxidant response in Caco-2 cells

- exposed to iron/ascorbate-mediated lipid peroxidation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2003; 285: G898-906.
104. Genova diagnostic. Intestinal permeability assessment. 2007. Diunduh dari: URL <http://www.gdx.net/us/assessment/ip/report>. Diakses 30 Maret 2007.
 105. Van der Pol RJ, Alatas FS, Firmansyah A. Milk drink habits and prevalence of lactose malabsorption in senior high school students of SMUN 68, Jakarta Pusat. *JGAI*. 2007; 1: 127-33.
 106. Galpin L, Manary MJ, Fleming K, Ou CN, Ashorn P, Shulman RJ. Effect of *Lactobacillus* GG on intestinal integrity in Malawian children at risk of tropical enteropathy. *Am J Clin Nutr*. 2005; 82: 1040-5.
 107. Olivieri NF, Brittenham GM. Iron-chelating therapy and the treatment of thalassemia. *Blood*. 1997; 89: 739-61.
 108. Park M, Lopez MA, Gayahan V, Ganz T, Rivera S. Suppression of hepcidin during anemia requires erythropoietic activity. *Blood*. 2006; 108: 3730-5.
 109. Origa R, Galanello, Gatta T, et al. Liver iron concentration and urinary hepcidin in β thalassemia. *Hematologica*. 2007; 92: 583-8.
 110. Murphy AT, Witcher DR, Luan P, Wroblewski VJ. Quantitation of hepcidin from human and mouse serum using liquid chromatography tandem mass spectrophotometry. *Blood*. 2007; 110: 1048-54.
 111. Gardenghi S, Marongiu MF, Ramos P, Guy E, et al. Ineffective erythropoiesis in β thalassemia is characterized by increased iron absorption mediated by down regulation of hepcidin and upregulation of ferroportin. *Blood*. 2007; 109: 5027-35.
 112. Kattamis A, Papassotriou I, Palaiologou D, et al. The effects of erythropoietic activity and iron burden on hepcidin expression in patients with thalassemia major. *Hematologica*. 2006; 91: 809-11.
 113. Tanno T, Bhanu NV, Ornal PA, et al. High levels of GDF15 in thalassemia suppress expression of the iron regulatory protein hepcidin. *Nature Med*. 2007; 13: 1096-101.
 114. Timan IS, Firmansyah A, Kremo SB, Aulia D, Moeslichan MZ. Use of hepcidin in thalassemia. What's new? Proceeding The 7th Colloquium of

Asian Network For Clinical Laboratory Standardization and Harmonization (ANCLS); Kuala Lumpur, 9-10 Agustus, Malaysia, 2006.

115. Falzacappa MVV, Spacie M, Kessler R, Stoffe J, Hantze MW, Muckenthaler MU. STAT3 mediates hepatic hepcidin expression and its inflammatory stimulation. *Blood*. 2007; 109: 353-8.
116. Reyes M, Blanck HM, Grossnicklam D, CDC expert panel. Hemochromatosis for health care professionals. Diunduh dari: URL: <http://www.phppo.cdc.gov/phtscoding>. Diakses 2 Maret 2006.
117. Porter JB. Iron overload in hematologic disorders. Diunduh dari: URL: http://www.ironoverload-cme.com/text_only.htm. Diakses: 10 September 2007.
118. Walker M. Heart disease in thalassemia major. Patient management strategies for improving survival. Apo Pharma. London.



UNIVERSITAS INDONESIA FAKULTAS KEDOKTERAN

Jalan Salemba Raya No. 4 Jakarta Pusat
Telp. (021) 51611000
Kampus Eksakta Telp. 51610011, 51610012, 51610013, 51610014, 51610015, Fax: 51610016, e-mail: info@ui.ac.id

No: 20/PTSD.PK/ETIK/2006

KETERANGAN LOLOS KAJI ETIK ETHICAL CLEARANCE

Panitia Tetap Penilai Etik Penelitian, Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia dalam upaya melindungi hak asasi dan kesejahteraan subyek penelitian kedokteran, telah mengkaji dengan teliti protokol berjudul:
The Committee of The Medical Research Ethics of the Faculty of Medicine, University of Indonesia, with regards of the protection of human rights and welfare in medical research, has carefully reviewed the proposal entitled:

"GAMBAR FUNGSI SALIVAN CERMA DAN STATUS RESPONSA PADA PENYAKIT TALASSEMIA MAJOR"

Nama peneliti utama : dr. IMA S. TIMAN
Name of the principal investigator

Nama institusi : PATOLOGI KLINIS PERI/RSOR
Name of institution

Dan telah menyetujui protokol tersebut di atas.
and approved the above mentioned proposal



GANGGUAN FUNGSI SALURAN CERNA DAN STATUS HEPSIDIN PADA PENDERITA TALASEMIA MAJOR

Penjelasan mengenai penelitian:

Talasemia merupakan suatu kelainan bawaan yang menyebabkan gangguan pembentukan zat hemoglobin yang terkandung di dalam sel darah merah. Hemoglobin merupakan suatu zat pembawa oksigen ke seluruh tubuh. Kekurangan hemoglobin menyebabkan penderitaanya kurang mendapat oksigen serta zat lain yang juga diperlukan oleh tubuh. Penderita talasemia mayor atau talasemia berat umumnya mempunyai kadar hemoglobin yang sangat rendah sehingga memerlukan transfusi berulang. Pada anak penderita talasemia dapat terjadi kelebihan besi akibat transfusi berulang. Kelebihan besi dalam tubuh dapat bersifat sebagai zat racun bagi organ tubuh sehingga mungkin dapat mengakibatkan kerusakan berbagai bagian tubuh lainnya, antara lain pada saluran cerna.

Untuk mengetahui apakah anak dapat menyerap zat gizi yang diberikan melalui makanan sehari-hari maka peneliti akan melakukan pemeriksaan terhadap fungsi saluran cerna dengan memberikan larutan gula vani kepada anak dan melihat kemampuan anak untuk menyerap zat makanan tersebut. Pemeriksaan akan dilakukan di Departemen Patologi Klinik RSCM Jakarta. Sehubungan pemeriksaan kami mohon agar anak dipuasakan sejak jam 8 malam, tetapi boleh minum air putih dengan bebas.

Kami berharap agar Bapak/Ibu bersedia mengijinkan anaknya untuk ikut serta dalam penelitian ini. Bila bersedia maka pada anak akan dilakukan pengambilan darah sebanyak kurang lebih 1 sendok teh (5 ml). Pada anak akan diberikan setengah gelas kecil gula vani untuk diminum dan diminta menampung air seni dalam tempat yang telah disediakan selama penelitian (sekitar 4 jam) serta sedikit contoh feka.

Semua data penelitian ini akan diperlakukan secara rahasia sehingga tidak memungkinkan orang lain menghubungi Bapak/Ibu.

Bapak/Ibu bebas untuk menolak ikut dalam penelitian ini apabila anda berkeberatan. Bila anda bersedia untuk ikut, mohon membalikkan tanda tangan di bawah ini. Bila ada pertanyaan maka Bapak/Ibu dapat menghubungi : dr. Ina S. Timan, di Departemen Patologi Klinik FKUI/RSCM, Jl Diponegoro No. 69 Jakarta Pusat, telepon 3142265 atau 3147713.

Jakarta, 14 Maret 2009

(dr. Ina S. Timan)

FORMULIR PERSETUJUAN

Semua penjelasan di atas telah disampaikan kepada saya, dan dengan menandatangani formulir ini saya setuju untuk ikut dalam penelitian ini.

Nama peserta : _____

Tanda tangan : _____

Tanggal : _____

Tertanda,

VALIDASI PEMERIKSAAN LAKTASE DENGAN KCKT

Prosedur kerja validasi KCKT untuk penetapan kadar laktosa - laktulosa

Alat :

Digunakan alat Prominence Liquid Chromatograph - LC-20AD (Shimadzu) yang dilengkapi dengan degasser DGU-20A, autosampler SIL-20A dan Column Oven CTO-10AS₁₀ (Shimadzu). Untuk detektor digunakan Refractive Index Detector (RID), Shimadzu RID-10A. Kolom yang digunakan adalah kolom Carbohydrate analysis 3.5x300 mm, 10 µm (Waters). Sistem integrasi data menggunakan software LC Solution, Shimadzu

Kondisi analisis kromatografi :

Digunakan detektor RID dengan temperatur cell 50°C, polaritas (+) dengan auxiliary range 1×10^{-4} RIU/Volt. Temperatur kolom Carbohydrate analysis 50°C. Sebagai fase gerak digunakan larutan acetonitril/akuabidestilat (80/20) dengan laju alir 1,3 mL/menit, volume injeksi 50 µL.

Ekstraksi sampel :

Sebanyak 1 ml urine dimasukkan ke dalam tabung sentrifus, ditambahkan 1 ml acetonitril dan 1 ml CHCl₃, kemudian divorteka selama 30 detik dan di sentrifus pada kecepatan 4000 rpm selama 15 menit. Pisahkan lapisan organik pada permukaan, masukkan ke dalam vial autosampler dan akan dimasukkan ke dalam sistem kromatografi sebanyak 50 µL.

Validasi metode

Uji stabilitas larutan induk

Larutan stok laktulosa dan laktosa dengan konsentrasi masing-masing 100 ppm dianalisis stabilitasnya di jam ke 6 dan 24 setelah pembuatan pada suhu kamar serta lemari es pada hari 1 dan hari ke 8. Analisa stabilitas sampai menunjukkan tanda ketidakstabilan yang dinyatakan dengan % perbedaan (*difference*) terhadap larutan baru. Nilai yang didapatkan tidak lebih dari 2 %.

Tabel 1. Stabilitas larutan standard laktosa laktulosa pada suhu kamar

Sampel	Luas Puncak Laktosa	Rata-rata	% perbedaan	Luas Puncak Laktulosa	Rata-rata	% perbedaan
Stabilitas jam ke-0	485165	475880	-	494738	493794	-
	466595			490670		
Stabilitas jam ke-6	466170	470504	-1,1297	504617	494716,3	0,8296
	474838			488936		
Stabilitas jam ke-24	477218	475408	1,0421	483820	495590	-0,2388
	473598			507560		

Tabel 2. Stabilitas larutan standard laktosa laktulosa pada suhu lemari es

Sampel	Luas Puncak Laktosa	Rata-rata	% DRI	Luas Puncak Laktulosa	Rata-Rata	% DRI
Stabilitas hari 1	485165	475880	-	494738	493794	-
	466595			490670		
Stabilitas hari 8	470633	472730	-0,6619	494314	491632,5	1,0007
	474827			500951		

Nilai stabilitas pada suhu kamar hingga jam ke 24 dan pada suhu lemari es hingga hari ke 8 masih dalam batas-batas nilai yang diperbolehkan.

Uji limit kuantitasi dan limit deteksi

Larutan standard laktulosa dan laktosa dengan konsentrasi masing-masing 25, 20, 15, dan 10 ppm dituangkan sebanyak 200 µl ke dalam sistem kromatografi. Kemudian dihitung tinggi puncak pada masing-masing kromatogram. Dihitung nilai perbandingan tinggi puncak dengan tinggi derau (S/N = Signal to noise ratio). Untuk tinggi derau (noise) digunakan pelatuk (Das gerak), kemudian pada kromatogram dihitung tinggi derau tertingginya.

Tabel 3. Limit deteksi dan limit kuantitasi

Konsentrasi Larutan (ppm)		Tinggi puncak (H)		S/N	
Laktulosa	Laktosa	Laktulosa	Laktosa	Laktulosa	Laktosa
25	25	2774	1582	15,19879	10,57987
20	20	2067	1376	17,48266	8,162092
15	15	1469	1087	1,797386	7,169935

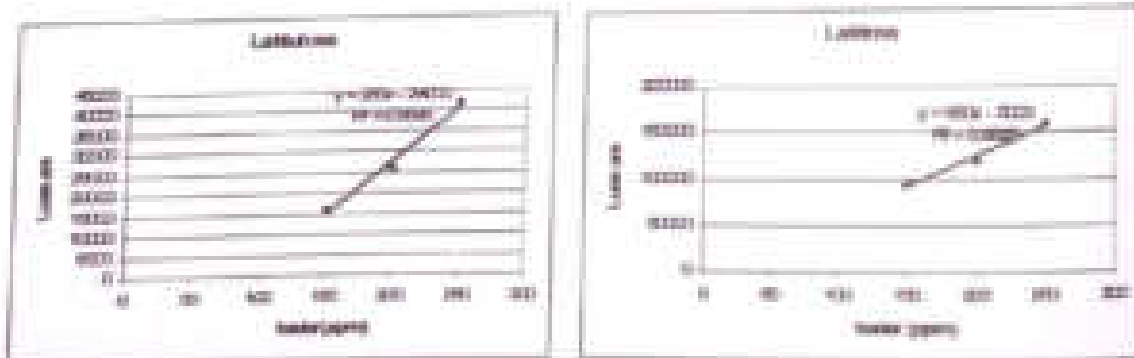
Tinggi Noise = 135

Untuk perhitungan S/N laktosa dan laktulosa didapatkan nilai antara 7,16 – 10,33 dan 9,79 – 15,51.

Larutan standard laktulosa dan laktosa dengan konsentrasi masing-masing 150, 200 dan 250 dalam urine disuntikkan kedalam sistem kromatografi sebanyak lima kali. Dihitung koefisien variasinya (CV) dan % d. Nilai yang didapatkan masing-masing konsentrasi tidak boleh lebih dari 20 %.

Tabel 4. Uji limit deteksi dan limit kuantitasi laktosa dalam urine

Konsentrasi	Limit puncak	rata-rata	SD	CV
150 ppm	130274	161046,4	14977,998	9,297527
	160966			
	161766			
	181149			
	143327			
200 ppm	173341	99221,8	20535,727	20,70065
	94500			
	117265			
	86940			
	34621			
100 ppm	79769	95697,2	12033,74	12,57481
	108279			
	86837			
	104174			
	68607			



Gambar 1. Uji limit deteksi dan limit kuantitasi laktosa dalam urine

Tabel 5. Uji limit deteksi dan limit kuantitasi laktulosa dalam urine

Konsentrasi	Luas puncak	rata-rata	sd	CV
250 ppm	538315	354033	26381,13	4,761653
	530431			
	533463			
	563159			
200 ppm	574618	339793	42664,33	11,35745
	359006			
	360904			
	334808			
150 ppm	360406	303417,8	16486	5,357064
	263341			
	363073			
	323843			
	301056			
	306973			
	283518			

Limit deteksi dalam urin untuk laktosa dan laktulosa yang didapat adalah 250 ppm.

Uji linearitas

Larutan standar laktulosa dan laktosa diencerkan dengan urin sehingga didapat larutan urin yang mengandung campuran laktulosa dan laktosa masing-masing 25, 50, 100, 250, 500, 1000 dan 1250 ppm. Diambilkan sebanyak 50 μ l. ke dalam sistem kromatografi. Kemudian dibuat kurva persamaan garis regresi linier, luas puncak laktulosa dan laktosa terhadap konsentrasi laktulosa dan laktosa. Dihitung nilai koefisien korelasinya.

Tabel 6. Kurva kalibrasi standar laktulosa dan laktosa

Konsentrasi standar laktulosa (ppm)	Luas Puncak Laktulosa	Persamaan garis	Konsentrasi standar laktosa (ppm)	Luas Puncak Laktosa	Persamaan garis
0	0	$y = 785,86x - 3457,9$	0	0	$y = 768,03x - 6700,5$
25,99	12018		25,02	16289	
49,98	15928	$r = 0,9993$	50,04	31441	$r = 0,9997$
99,96	71754		100,08	64031	
249,9	174929		250,2	183628	
499,8	257704		500,4	364086	
749,7	398533		750,6	584293	
999,6	771188		1000,8	758382	
1249,5	980817		1251	954172	

Perhitungan akurasi dan presisi

Tabel 8. Perhitungan akurasi dan presisi laktosa

Konsentrasi sebenarnya laktosa (ppm)	Lotus pemak laktosa	Konsentrasi terukur (ppm)	% akurasi	SD	Rata-rata	CV dan d
24,99	80942	24,65	98,66	1,06	99,38	1,06
	81927	24,85	99,41			
	82467	25,08	100,34			
	80181	24,58	98,35			
	83481	25,17	100,70			
499,9	2432708	497,27	99,47	0,81	999,32	1,81
	2439981	502,94	100,61			
	2443567	495,71	99,36			
	2443104	499,54	99,91			
	2430014	505,78	101,36			
1249,3	6233016	1237,99	100,68	1,30	1249,29	1,30
	6238517	1261,28	100,97			
	6278298	1228,48	98,29			
	6286415	1271,26	101,74			
	6136803	1245,13	99,65			

Larutan standar yang mengandung konsentrasi laktulosa dan laktosa masing-masing 25, 500 dan 1250 ppm (*low, medium dan high*) diantikkan sebanyak 20 uL lima kali pada hari yang sama. Dihitung nilai persentase akurasi (%) dan koefisien variasi (CV) dari masing-masing larutan tersebut. Nilai koefisien variasi dan % diff dari masing-masing konsentrasi tidak lebih dari 1,5 %. Hal yang sama dilakukan pada bentuk urine yang mengandung 250 ppm laktosa dan laktulosa.

Tabel 9. Perhitungan akurasi dan presisi laktulosa

Konsentrasi sebenarnya laktulosa (ppm)	Lotus pemak laktulosa	Konsentrasi terukur (ppm)	% akurasi	SD	Rata-rata	CV dan d
25,01	27669	25,37	101,41	0,91	999,81	0,91
	56302	25,14	100,45			
	33159	24,90	99,56			
	38402	25,31	101,20			
	37902	25,27	100,91			
499,9	2627823	498,77	99,77	1,18	499,42	1,18
	2532927	490,68	98,35			
	2582879	494,68	99,15			
	2561302	498,19	99,66			
	2581277	495,17	99,06			
1249,3	6584768	1258,41	101,44	1,17	1249,91	0,94
	6216143	1232,18	100,68			
	6230108	1237,72	99,89			
	6878338	1264,68	101,94			
	6720813	1273,28	101,84			

Tabel 10. Perhitungan akurasi dan presisi laktosa urin

Konsentrasi sebenarnya (ppm)	Loss Puncak	Konsentrasi Terukur (ppm)	Rata-rata	SD	CV (%)	% diff
250	91074	265,05	267,17	23,28	8,04	-3,96
	111766	276,28				10,51
	104566	262,24				-4,91
	113949	265,50				12,20
	86127	228,64				-8,34

Tabel 11. perhitungan akurasi dan presisi laktulosa urin

Konsentrasi sebenarnya (ppm)	Loss Puncak	Konsentrasi Terukur (ppm)	Rata-rata	SD	CV (%)	% diff
250	148557	231,74	248,43	29,38	10,17	1,47
	130403	226,71				-8,32
	211504	220,02				-11,99
	176201	217,44				10,98
	184050	268,22				7,89

Presisi untuk laktosa laktulosa dalam urin masih dalam batas yang diperbolehkan yaitu nilai koefisien variasi 9,04% dan 10,17 % pada lima replikasi penyuntikan. Akurasi memenuhi persyaratan dengan tingkat α perbedaan (D) -9,34 – 12,20 untuk laktosa dan antara -11,99 hingga 10,98 % untuk laktulosa.

Tabel 12. Tabel perolehan kembali (recovery) laktosa

Konsentrasi sebenarnya (ppm)	Loss Puncak	Konsentrasi Terukur (ppm)	% Perolehan kembali	Rata-rata	SD	CV (%)
250	91074	265,05	96,04	102,97	9,10	8,04
	111766	276,28	110,51			
	104566	262,24	104,92			
	113949	265,50	112,20			
	86127	228,64	91,86			

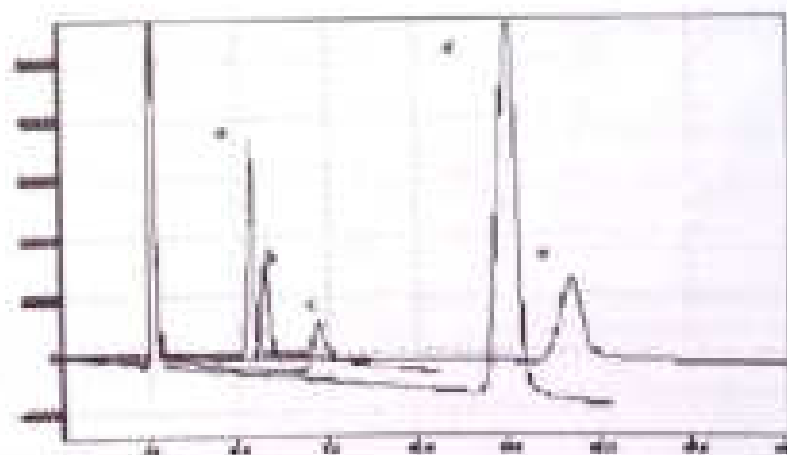
Tabel 13. Tabel perolehan kembali (*recovery*) laktulosa

Konsentrasi sebenarnya (ppm)	Luas Puncak	Konsentrasi Terukur (ppm)	% Perolehan kembali	Rata-rata	SD	CV (%)
250	248537	253,74	101,49	99,77	10,15	10,17
	220463	226,71	90,68			
	213504	230,02	88,01			
	273201	277,44	110,98			
	264650	269,21	107,69			

Perolehan kembali (*recovery*) ditunjukkan dengan persentase perolehan kembali dari larutan laktosa dan laktulosa 250 ppm yakni untuk laktosa dalam rentang 90,68 – 112,20 % dan untuk laktulosa berada dalam rentang 88,01-107,69 %.

Uji selektivitas

Sebanyak 1 mL urine sebagai blanko, dimasukkan ke dalam tabung sentrifus, ditambahkan 1 ml acetonitril dan 1 ml CHCl₃, kemudian divortex selama 30 detik dan di sentrifus pada kecepatan 4000 rpm selama 15 menit. Pisahkan lapisan organik dalam supernatan, masukkan ke dalam vial autosampler dan disuntikkan ke dalam sistem kromatografi sebanyak 50 µL. Diamati adanya gangguan pada kromatogram di sekitar waktu retensi laktulosa dan laktosa. Langkah yang sama dilakukan pada urine yang mengandung laktulosa dan laktosa 100, 300, dan 500 ppm.



Gambar 4. Waktu retensi untuk senyawa lain

Keterangan : berturut-turut kromatogram untuk a. galaktosa, b. fruktosa, c. Gliserasol, d. laktulosa, e. laktosa.

Lampiran 4.

PEMERIKSAAN PENDAHULUAN UNTUK ESTIMASI BESAR SAMPEL

1. Pemeriksaan pendahuluan untuk elastase

Dalam perhitungan estimasi jumlah sampel diperlukan data mengenai proporsi gangguan elastase-I tinja pada penderita talasemia tanpa kelebihan besi. Proporsi tersebut belum dapat dijumpai di telah pustaka, oleh karena itu dilakukan penelitian pendahuluan untuk mendapatkan nilai P_1 untuk perhitungan nilai sampel yang sebenarnya dengan menggunakan 21 sampel tinja penderita talasemia tanpa kelebihan besi.

Hasil pemeriksaan elastase

Tabel 1. Kadar elastase kontrol

NO	UMUR (tahun)	BB (kg)	TB (cm)	Saturasi (%)	Elastase (mg/g)
K1	4	9	80	28,7	242,48
K2	5,5	25	132	20,9	202,10
K3	1	12	94	47,1	378,90
K4	6	15	108	21,6	492,18
K5	4	12,5	120	26,7	425,90
K6	1	20	123	26,4	99,10
K7	8,2	25	118	46,7	300,90
K8	1	15,8	85	54,2	478,02
K9	9	38	148	24,2	128,10
K10	4	12,7	99	18,7	381,20
K11	7,2	24	108	12,8	107,48
K12	1,6	9,7	86	37,2	114,80
K13	10	23,5	117	51,2	462,20
K14	1	12	96	20,4	273,07
K15	2,3	11	84	39,7	361,0
K16	20	48	128	20,4	485,8
K17	27	40	150	42,1	75,16
K18	34	76	166	28,7	271,60
K19	42	53	160	28,2	283,6
K20	41	54	157	36,7	449,9
K21	1	19	116	43,0	79,21

Status normal elastase yang digunakan adalah 200 mg/g .^{28,29} Hasil pemeriksaan di bawah nilai tersebut dianggap abnormal rendah. Hasil yang rendah menggambarkan adanya insufisiensi pankreas. Proporsi elastase abnormal pada kelompok talasemia tanpa kelebihan besi adalah $4/21 (0,19) = 0,2$

2. Perhitungan estimasi besar sampel untuk laktase :

2.1. Penentuan nilai rujukan

Telah dilakukan penelitian pendahuluan untuk penetapan kadar laktase pada subjek sehat secara klinis. Subjek diberi pembebanan laktosa dan laktulosa sebesar 0,4 g/kg berat badan secara oral sama seperti perlakuan terhadap kontrol talasemia tanpa hemokromatosis dan subjek talasemia dengan hemokromatosis. Subjek penelitian dianjurkan untuk minum air putih dan dilakukan pengumpulan urine pada jam ke 0, 2 dan ke 4 pasca pembebanan. Urine dikumpulkan dan dibekukan (-20°C) untuk pemeriksaan laktosa/laktulosa¹⁷⁾.

Tabel 2. Laktosa laktulosa pada subjek sehat

Parameter	n	Berat/median	Rentang nilai
Laktosa (ug/ml.)	20	18,3 / 0	0 - 76,0
Laktulosa (ug/ml.)	20	17,0 / 0	0 - 82,0
Laktosa	20	0,7 / 1,1	0 - 7,5
Ratio ekskresi / asupan laktosa	20	1,2 / 0	0 - 4,6
Ratio ekskresi / asupan laktulosa	20	1,0 / 0	0 - 5,0

Laktosa dan Laktulosa (ug/ml.) adalah besarnya masing-masing laktosa dan laktulosa yang diekskresi di urin dan diekskresikan melalui urin. Ratio laktosa dan laktulosa menggambarkan aktivitas laktase di usus. Ratio ekskresi/ asupan laktosa atau laktulosa adalah ratio antara laktosa dan laktulosa yang keluar melalui urin dibandingkan dengan jumlah asupan yang diberikan. Pada penelitian ini didapatkan nilai median untuk ratio laktosa/laktulosa adalah 1,1.

2.2. Penentuan proporsi gangguan laktase pada kelompok talasemia tanpa hemokromatosis

Untuk perhitungan jumlah sampel laktase (ratio laktosa laktulosa) diambil hasil dari 15 subjek kontrol dan digunakan batas nilai median dari kontrol subjek sehat.

Tabel 3. Aktivitas laktase pada talasemia tanpa hemokromatosis

NO	Kemerasan Transferrin	Kadar HbH	Kadar Laktosa	Kadar Laktosa	Aktivitas Laktosa	Pembelahan laktosa:	Rasio laktosa/total	Rasio laktosa/total
	(%)	(g/dl)	(mg/dl)	(mg/dl)	(Banc)	(g)		
K1	20,9	2,73	0,0	0,0	0,0	10	0,00	0,00
K2	47,1	1,57	138,7	72,1	5,0	4,8	74,72	11,03
K3	21,4	-0,10	200,0	188,7	1,3	6	0,00	18,50
K4	30,2	1,49	48,1	104,8	0,3	3,4	3,80	1,18
K5	20,4	0,11	39,3	12,7	1,7	10,4	8,81	1,05
K6	46,2	0,06	81,4	9,7	8,4	9,7	15,08	10,71
K7	54,0	1,01	66,4	47,1	1,4	4,4	0,74	0,51
K8	24,2	0,24	11,3	7,8	1,3	15,2	0,00	0,00
K9	10,7	-0,24	0,0	0,0	0,0	5	17,51	17,24
K10	12,6	-0,2	168,1	167,8	1,0	8,6	0,00	0,00
K11	27,2	0,8	0,0	0,0	0,0	3,8	31,81	12,18
K12	31,2	2,22	477,7	114,1	4,2	9,4	2,84	0,02
K13	20,4	0,78	12,7	0,0	0,0	4,8	92,02	55,13
K14	43,0	1,16	700,2	410,0	1,7	7,0	0,56	0,33
K15	16,8	0,07	0,1	1,4	1,7	16,4		

Batas rujukan dari koefisi sebesar 1,1 (median) digunakan untuk menentukan proporsi banyaknya laktase abnormal. Dari tabel di atas didapatkan proporsi laktase abnormal pada 9/15 (0,6) subjek talasemia tanpa hemokromatosis.

Proporsi penderita talasemia dengan laktase rendah = 0,6

$$P1 = 0,6 ; d = 0,25 ; P2 = 0,4 + 0,25 = 0,65 \rightarrow P = (0,6 + 0,65) / 2 = 0,725$$

$$Q1 = 0,4 ; Q2 = 0,15 \rightarrow Q = (0,4 + 0,15) / 2 = 0,275$$

$$z_{\alpha} \text{ (pada } \alpha = 0,05 \rightarrow = 1,96) \quad Z_{\beta} = 10\% \rightarrow 0,842$$

$$n1 = n2 = \left\{ \frac{1,96 \sqrt{(2 \times 0,725 \times 0,275)} + 0,842 \sqrt{0,6 \times 0,4} + (0,65 \times 0,15)}{d} \right\}^2$$

$$n1 = n2 = 48$$

Bila diperkirakan kemungkinan drop out sebesar 20% maka jumlah subjek yang akan diambil adalah :

$$n' = 1 / (1 - 0,2) \times 48 = 60$$

Diambil 60 pasien/ kelompok

Rumus perhitungan untuk uji korelasi : Antara masing-masing saturasi transferin dan NTBI dengan elastase dan laktase

$$N = \left\{ \frac{Za + Z\beta}{0,5 \ln(1+r)(1-r)} \right\}^2 + 3$$

Tabel 4. Korelasi Saturasi transferin dan NTBI terhadap elastase dan laktase kelompok kontrol

Parameter	Korelasi (r)			
	Elastase	P	Laktase	P
Saturasi transferin	0,233	0,331	0,556	0,031
NTBI	0,088	0,711	0,247	0,395

3. Perhitungan jumlah sampel uji korelasi saturasi transferin dan elastase

$$N = \left\{ \frac{1,96 + 0,842}{0,5 \ln(1+0,233)(1-0,233)} \right\}^2 + 3$$

$$N = 2,802 / (0,5 \ln 1,597) = 128$$

4. Perhitungan jumlah sampel uji korelasi saturasi transferin dan laktase

$$N = \left\{ \frac{1,96 + 0,842}{0,5 \ln(1+0,556)(1-0,556)} \right\}^2 + 3$$

$$N = 2,802 / (0,5 \ln 3,545) = 25$$

5. Perhitungan jumlah sampel uji korelasi NTBI dan elastase

$$N = \left\{ \frac{1,96 + 0,842}{0,5 \ln(1+0,1)(1-0,1)} \right\}^2 + 3$$

$$N = 2,802 / (0,5 \ln 1,222) = 787$$

6. Perhitungan jumlah sampel uji korelasi NTBI dan laktase

$$N = \left\{ \frac{1,96 + 0,842}{0,5 \ln(1+0,25)(1-0,25)} \right\}^2 + 3$$

$$N = 2,802 / (0,5 \ln 1,667) = 124$$

7. Perhitungan ulang estimasi besar sampel korelasi NTBI dan elastase

$$N = \left\{ \frac{1,96 + 0,842}{0,5 \ln(1+0,4)(1-0,4)} \right\}^2 + 3$$

$$N = 2,802 / (0,5 \ln 2,333) = 46$$

Lampiran 5.

PEMERIKSAAN LABORATORIUM

1. Pemeriksaan darah lengkap

Pemeriksaan hemoglobin, hematokrit, hitung eritrosit, VEH, HEB, KHEB, RDW, hitung leukosit, hitung trombosit dan retikulosit dengan memakai alat penghitung sel darah otomatis Sysmex XT2000i.

Prinsip pemeriksaan ⁽¹⁾

Darah yang masuk ke dalam alat akan mengalami pengenceran, kemudian masuk ke dalam *transducer*. Dalam ruang *transducer*, terdapat lubang kecil (*apertur*) yang di kedua sisinya terpasang elektroda. Antara kedua elektroda ini mengalir arus listrik searah. Sel darah yang tercampur dalam bahan akan melewati *apertur* tersebut. Pada saat sel lewat, terjadi perubahan tahanan listrik yang sebanding dengan besarnya volume sel darah. Perbedaan tahanan listrik ini akan diperkuat dan diteruskan ke *diskriminator*.

Bahan

Darah EDTA 0,5 ml.

Reagen yang digunakan

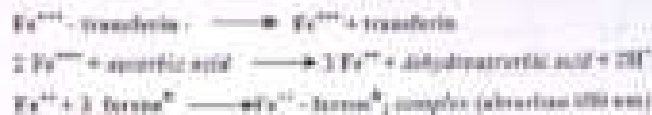
- Cell-Pack PK-30L sebagai larutan pengencer, berisi NaCl 6,38 g/L, asam borat 1,0 g/L, sodium tetraborat 0,20 g/L dan K₂EDTA 0,2 g/L.
- Stromatolyzer-WH 5WH-200 sebagai larutan pelaris eritrosit pada penghitungan leukosit, berisi organik quaternary ammonium salt 10,2 g/L dan NaCl 2,0 g/L.
- Bahan kontrol Eightsheck 3 W7-H 3 level lot no. 4362-0821, 4362-0822 dan 4362-0823.

2. Pemeriksaan kadar besi serum ^{(1),(2)}

Pemeriksaan besi serum dengan alat analisis kimia otomatis Dimension dari Dade Behring

Prinsip pemeriksaan

Dalam keadaan asam (pH 4,5) besi yang terikat dengan transferrin akan dilepas. Adanya zat pereduksi asam askorbat, besi bentuk ion feri akan tereduksi menjadi ion ferro. Fe^{2+} akan membentuk kompleks berwarna biru bila bereaksi dengan 3-(2-pyridyl)-5,6-bis-2-(3-feryl sulfonic acid)-1,2,4-triazine disodium salt (Ferrostat[®]). Absorban dari kompleks tersebut dibaca dengan memakai gelombang bikromatik pada panjang gelombang 600 nm dan 700 nm memakai teknik end point. Pembacaan pada panjang gelombang 600 nm untuk analisisnya sedangkan pembacaan pada panjang gelombang 700 nm untuk zat interferensi. Selisih absorban sebanding dengan kadar analit yang sebenarnya. Pemberian *askorbat* untuk mengurangi pengaruh adanya tembaga yang terdapat dalam serum. Besarnya absorban menggambarkan kadar besi yang terikat pada transferrin serum.



Bahan pemeriksaan

Serum yang telah dipisahkan dengan segera dari bahan darah, serum tidak keruh atau hemolisis. Nilai rujukan : 33-150 $\mu\text{g/dL}$, batas linearitas 0-1000 $\mu\text{g/dL}$.

Reagen yang digunakan :

- IEN Flex® reagent cartridge kat. no DF49A terdiri dari : askorbat acid tablet 85 mM/L, liquid ferrostat[®] 0,625 mM/L, liquid Thiourea 50 mM/L, bufer asetat 750 mM/L.
- Kontrol 1 rentang nilai 170-255 $\mu\text{g/dL}$.
- Kontrol 2 rentang nilai 80-120 $\mu\text{g/dL}$.

3. Pemeriksaan daya ikat besi total serum ^(17,18)

Dilakukan dengan alat analisis kimia otomatis Dimension dari Dade Behring.

Prinsip pemeriksaan

Transferrin serum dijenakkan dengan besi dengan cara menambahkan *iron saturating solution*. Bahan pemeriksaan kemudian melewati *alumina cartridge*,

besi yang belum terikat akan diabsorpsi. Besi yang terikat dengan transferrin berada di *eluate*, pH 4,5 akan menyebabkan besi lepas dari transferrin. Adanya zat pereduksi asam askorbat, besi bervalensi ion feri akan tereduksi menjadi ion ferus. Ion Fe^{2+} akan membentuk kompleks berwarna biru dengan *3-(2-pyridyl)-5,6-dihydro-2-(2-furyl sulfonic acid)-1,2,4-triazine disodium salt (ferene[®])*. Absorban kompleks ini dibaca pada panjang gelombang 600 dan 700 nm dengan teknik *endpoint*. Pembacaan pada panjang gelombang 600 nm untuk analitnya sedangkan pembacaan pada panjang gelombang 700 nm untuk zat interferensi. Selisih absorban sebanding dengan kadar analit yang sebenarnya. Biasanya absorban menggambarkan kadar besi yang terikat pada transferrin.



Reagen yang digunakan

- TIBC *pre-treatment kit* kat. no G081 terdiri dari: *stock iron saturating solution* : Fe^{3+} dalam 0,1 M *ascorbic acid*, *albumin* 250 mg/cartridge
- TIBC *Flexi reagent cartridge* kat. no D183 terdiri dari : *ascorbic acid* 85 mM/L, *liquid ferene[®]* 0,625 mM/L, *liquid Thiourea* 50 mM/L, *buffer acetate* 750 mM/L.

Bahan kontrol cat no ED 228:

- Hematocritis level 1 rentang nilai 193-313 $\mu g/dL$.
- Hematocritis level 2 rentang nilai 313-413 $\mu g/dL$.

Bahan pemeriksaan : serum yang segera dipisahkan dari bahan darah, serum tidak keruh dan hemolisis.

Nilai rujukan : 20-445 $\mu g/dL$, linearitas 0-1000 $\mu g/dL$.

Nilai saturasi transferrin dihitung dengan rumus :

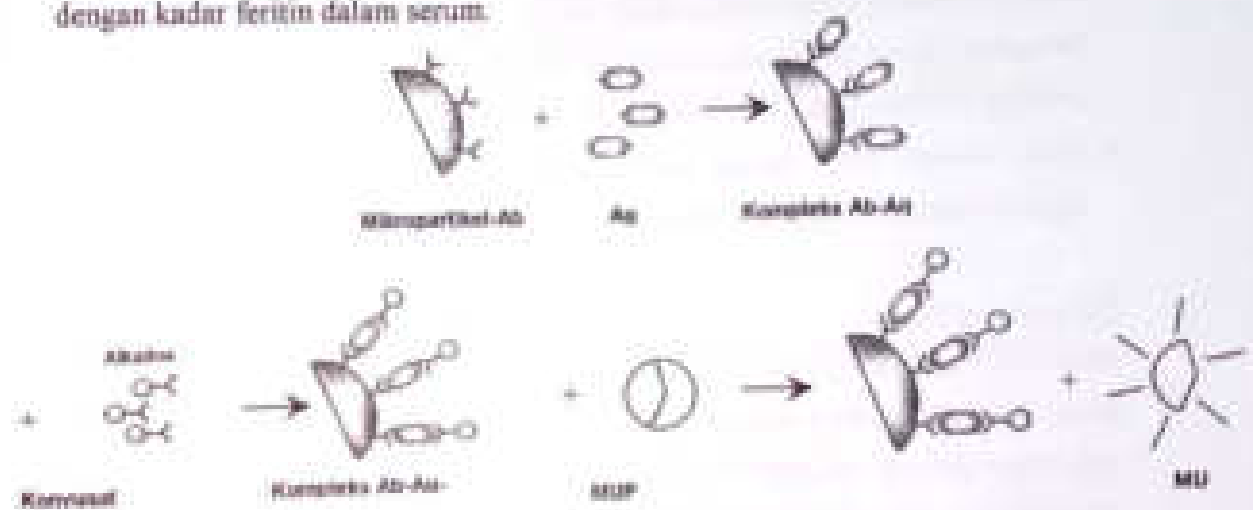
$$\text{Saturasi Transferrin} = \frac{\text{besi serum}}{\text{daya ikat besi total serum}} \times 100\%$$

4. Pemeriksaan feritin⁽⁸⁸⁾:

Pemeriksaan feritin serum dilakukan dengan alat analisis imunologi otomatis Elecsys (Roche Diagnostics) dengan cara Metode *microparticle enzyme immunoassay* (MEIA).

Prinsip pemeriksaan

Feritin dalam serum akan berikatan dengan antiferritin yang melapisi mikropartikel, sehingga terbentuk ikatan feritin-antiferitin. Penambahan antiferritin berlabel enzim alkali fosfatase akan menyebabkan terbentuknya kompleks antiferritin-feritin-antiferitin berlabel alkali fosfatase. Alkali fosfatase akan memecah substrat *4-methylumbelliferyl phosphate* dan menimbulkan fluoresensi yang akan dibaca oleh sistem optik MEIA. Fluoresensi yang terbentuk sebanding dengan kadar feritin dalam serum.



Gambar 3.1. Prinsip pemeriksaan feritin⁽⁸⁸⁾

Reagen yang digunakan

- Roche feritin reagent pack cat no 2219-20
- Satu botol 6,5 mL anti-feritin (mouse, monoclonal) coated microparticles di dalam bufer dengan stabilizer protein, sodium azide 0,2%.
- Satu botol 4,5 mL anti-feritin (rabbit) - alkaline phosphatase conjugate di dalam bufer dengan stabilizer protein, sodium azide 0,2%.
- Satu botol 10 mL 4-methylumbelliferyl phosphate 1,2 mM di dalam bufer; sodium azide 0,1%.

- Satu botol 9 mL *ferritin diluent*. Bufer mengandung surfaktan dan *stabilizer* protein, sodium azide 0,1%.
- Reagen tahan sampai waktu kadaluwarsa pada suhu 2-8°C. Dapat dipakai segera sesudah dikeluarkan dari lemari pendingin.
- Roche *ferritin Calibration* cat no.9c0101
- Enam botol (8) 4 mL bahan kalibrator dari limpa manusia yang dikalibrasi terhadap standar *ferritin*, di dalam bufer dengan *stabilizer* protein. Kadar ferritin sebagai berikut : botol A 0 ng/mL, botol B 10 ng/mL, botol C 50 ng/mL, botol D 250 ng/mL, botol E 500 ng/mL, botol F 1000 ng/mL. Sodium azide 0,2%.
- Kalibrator tahan sampai waktu kadaluwarsa pada suhu 2-8°C. Dapat dipakai segera sesudah dikeluarkan dari lemari pendingin.
- Roche *ferritin Controls* cat no.9c0110
- Tiga botol (9) 8 mL bahan kontrol dari limpa manusia, di dalam bufer dengan *stabilizer* protein. Kadar ferritin sebagai berikut : botol L 20 ng/mL (rentang 16-24 ng/mL), botol M 150 ng/mL (rentang 120-180 ng/mL), botol H 400 ng/mL (rentang 320-480 ng/mL). Sodium azide 0,2%.
- Bahan kontrol tahan sampai waktu kadaluwarsa pada suhu 2-8°C. Dapat dipakai segera sesudah dikeluarkan dari lemari pendingin.

Bahan pemeriksaan:

Serum atau plasma heparis. Pemeriksaan segera dilakukan setelah pengambilan bahan. Pemeriksaan yang ditunda > 24jam, bahan dibekukan. Hindari proses beku cair. Bahan pemeriksaan tidak boleh keruh, hemolisis.

Nilai rujukan : 10,1 – 62,9 ng/mL, linieritas 1-1000 ng/mL.

5. Pemeriksaan Non Transferrin Bound Iron (NTBI)⁽¹⁰⁾

Pemeriksaan ferritin serum dilakukan dengan slit Fluorometry dengan metoda fluorescent immunassay.

6. Pemeriksaan Hepsidin⁽¹¹⁾

Pemeriksaan dilakukan dengan cara mikro elisa menggunakan kit Hepsidin (*DRG instrument GmbH*) no. 4015 dengan microelisa reader (*Organon Technica*).

7. Pemeriksaan SGOT^(*)

Pemeriksaan dilakukan dengan cara kinetik menggunakan *automated chemical analyzer* (Hitachi 912)

Prinsip pemeriksaan:

Enzim SGOT akan mengkatalisa α ketoglutarat dan L-aspartat menjadi L-glutamat dan oksaloasetat. Oksaloasetat yang terjadi dengan bantuan Malat dehidrogenase (MDH) akan mengakibatkan oksidasi NADH menjadi NAD⁺. Kecepatan penurunan NADH yang ditemukan secara fotometrik berbanding lurus dengan aktivitas SGOT.

Prosedur pemeriksaan:

1. masukkan sampel serum ke dalam lubang sampel pada alat autoanalyzer
2. Sampel akan dicampur dengan larutan depot yang mengandung substrat α ketoglutarat, L-aspartat, MDH dan NADH
3. Perubahan absorpsi akan di deteksi pada 340 nm, dan aktivitas SGOT akan dihitung secara otomatis oleh alat.

Nilai normal : SGOT < 34 U/L

8. Pemeriksaan SGPT^(**)

Pemeriksaan dilakukan dengan cara kinetik menggunakan *automated chemical analyzer* (Hitachi 912)

Prinsip pemeriksaan:

Enzim SGPT akan mengkatalisa α ketoglutarat dan L-alanin menjadi L-glutamat dan piruvat. Piruvat yang terjadi dengan bantuan LDH akan mengakibatkan oksidasi NADH menjadi NAD⁺. Kecepatan penurunan NADH yang ditentukan secara fotometrik berbanding lurus dengan aktivitas SGOT.

Prosedur pemeriksaan:

1. Masukkan sampel serum ke dalam lubang sampel pada alat autoanalyzer
2. Sampel akan dicampur dengan larutan depot yang mengandung substrat α ketoglutarat, L-alanin, LDH dan NADH

3. Perubahan absorpsi akan di deteksi pada 340 nm, dan aktivitas SGPT akan dihitung secara otomatis oleh alat

Nilai normal : SGPT : < 35 U/L

3. Pemeriksaan albumin²⁰⁰

Pemeriksaan dilakukan dengan cara kolorimetrik endpoint, menggunakan *automated chemical analyzer* (Hitachi 912), dengan reagen Hitachi.

Prinsip pemeriksaan

Pada pH 4,1 albumin akan bereaksi dengan *bromocresol green* (BCG), membentuk kompleks albumin-BCG. Kompleks akan berwarna hijau kehijauan yang diukur secara fotometri. Intensitas warna sebanding dengan kadar albumin.



Reagen yang digunakan

- R1 buffer basis buffer sitrat : 95 mmol/L, pH 4,1, pengawet
- R2 substrat basis buffer sitrat 95 mmol/L, pH 4,1, *Bromocresol green* 0,56 mmol/L, pengawet

Bahan kontrol :²⁰⁰

- Precision U : rentang nilai sesuai lot.
- Precision D : rentang nilai sesuai lot.

Nilai rujukan : dewasa 3,4-4,8 g/dL

Neonatus 0-4 hari 2,8-4,8 g/dL

Anak usia 4 hari-14 tahun 3,8 - 5,4 g/dL

usia 14-18 tahun 3,2 - 4,5 g/dL ^{Prinsip albumin}

Liserasitas : 1 - 7 g/dL

Bahan pemeriksaan : serum atau plasma heparin atau plasma EDTA. Serum atau plasma segera dipisahkan dalam waktu 1 jam dan diperiksa segera mungkin.

Bahan pemeriksaan pada suhu 4°C stabil selama < 3 hari, -20°C stabil selama 6 bulan, -70°C stabil dalam jangka waktu yang tak terbatas.

10. Pemeriksaan kreatinin darah ⁽²⁰⁾

Prinsip pemeriksaan

Pemeriksaan ini adalah pemeriksaan kolorimetri kinetik. Dalam larutan alkali, kreatinin membentuk kompleks kuning-jingga dengan pikrat. Intensitas warna berbanding lurus dengan kadar kreatinin dan diukur secara fotometri.

Reaksi



Bahan serum

Reagen yang digunakan: CREA dari Roche, terdiri dari:

R1 : Natrium hidroksida: 0,20 mol/l

R2 : Asam pikrat : 25 mmol/l

Alat yang digunakan : *Analyzer* otomatis Hitachi 912

Cara pemeriksaan

Sebanyak 0,5 ml serum dimasukkan ke dalam sample cup Hitachi dan dimasukkan ke dalam cuvette alat, kemudian diperiksa dengan alat Hitachi 912.

11. Pemeriksaan Elastase I pankreas di tinja ⁽²⁰⁾

Pemeriksaan kadar elastase I pankreas dalam tinja dilakukan secara ELISA dengan *Scheibel Pancreatic Elastase I Stool Test, Bexell-Nr/Catalog No. 07*.

12. Pemeriksaan Aktivitas Laktase ⁽²⁰⁾

Pemeriksaan dilakukan dengan mengukur aktivitas laktase usus yang dinyatakan dalam rasio ekskresi laktulosa dan laktosa dalam urin. Penetapan nya dilakukan dengan cara kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT).

RIWAYAT HIDUP

Data pribadi

- Nama lengkap : Ica Susanti Timan
NIP : 130935268
Tempat dan tanggal lahir : Jakarta, 30 Juli 1955
Agama : Katolik
Suami : dr. Andi Sutarno, Sp.PD
Anak : Aditya Pratama Sutanto, DS
Eliasa Rania Sutanto
Natalia Rania Sutanto
Alamat rumah : Jl. Cawang Baru Barat no. 6, Jakarta 13340
Telp. 021-8190825
Alamat kantor : Departemen Patologi Klinik FKUI-RSCM
Jl. Diponegoro 69-71, Jakarta Pusat
Telp. 021-3143707

Pendidikan formal

- 1961 – 1967 : SD PSKD Kwitang 6, Jakarta
1968 – 1970 : SMP Tarakanita, Jakarta
1971 – 1973 : SMA Ursula, Jakarta
1974 – 1980 : FK Universitas Indonesia, Jakarta
1981 – 1985 : Pendidikan Dokter Spesialis Patologi Klinik FKUI,
Jakarta
1996 : Konsultasi Hematologi Patologi Klinik
2002 – 2007 : Pendidikan Program Studi 9-3 Ilmu Kedokteran
FKUI, Jakarta

Pendidikan/ Pelatihan/ Kursus tambahan di dalam dan luar negeri

- 1985 : WHO-IANIDA. Intercountry Course and Workshop
on Quality Assurance in Haematology (Jakarta)
1990 : JSPS Course in Haemostasis and Fibrinolysis
changes in infections (Kobe, Japan)
2000 : PCR in Hematologic Malignancies (Osaka, Japan)

Riwayat kepegawaian

- 1981 : Penata muda golongan IIIa
1985 : Penata muda Tk.I golongan IIIb
1992 : Penata golongan IIIc
1996 : Penata Tk.I golongan IIId
2004 : Pembina golongan IVa

Jabatan struktural

- 1987 – 1990 : Kepala seksi administrasi RSCM
1990 – 2005 : Koordinator administrasi dan keuangan FKUI
2006 – sekarang : Kepala laboratorium hematologi Departemen
Patologi Klinik RSCM

Riwayat jabatan fungsional di dalam dan luar lingkungan FKUI/UI

- 1986 – 1999 : Anggota Tim Monitoring dan Evaluasi Program
 Nasional Peningkatan Kualitas Laboratorium Klinik
 Bidang Hematologi DepKes

- 2000 – sekarang : Indonesian representative for Asian Network of Clinical Laboratory Scheme bidang Hematology
- 2003 – 2007 : Tim Promotasi Menu Eksternal Laboratorium Klinik bidang Hematologi Privasiun Dokter Spesialis Patologi Klinik

Kesanggupan profesi

- 1980 : Anggota Ikatan Dokter Indonesia
- 1996 : Anggota PDS Patologi Klinik
- 2005 : Anggota PCI
- 2007-10-29 : Anggota ICKI

Publikasi ilmiah

Karya tulis ilmiah sebagai penulis utama

1. Ina S. Timan, Noriyuki Tatumi, Yoshinori Fouhara, Diana Aulia, Sri Margono, Savitri Setyogi, Maria Abdolalan, Almond Borjaratvej, Sathat Facharoen, Yujire Asada, Akinobu Suniyoshi. Anemia in Indonesian School Children. *ICMR Annals* 2000;20:223-30
2. IS Timan, R. Wirawan, FX Hendriyana, D. Aulia. Proposed Evaluation of Laboratory Performance in an External Hematology Quality Control Scheme. *South East Asian J Trop Med & Public Health* 2002; 33(52): 18-24.
3. Ina S. Timan. Perubahan Hematologi Pada kehamilan. Buku : Pendidikan berkesinambungan Patologi Klinik 2002. Editor Marzuki Suryatmadja. Bag. Pat. Klinik FKUI. ISBN 979-97132-0-X. 2002:31-41.
4. Ina S. Timan, Diana Aulia, Djambura Atmahanusa, Am Sudoyo, Endang Windiantuti, Agus Kusnith. Some Hematological Problems in Indonesia. *International Journal of Hematology* 2002;76(51):286-290.
5. Timan IS, Aulia D, Santoso W. External quality assessment scheme and laboratory accreditation in Indonesia. *Riesko Dywi*. 2003; 2:126-30. Timan IS, Wirawan R, Aulia D, Machtar A. Preparation of Hemolyzate and Pseudo Leukocyte for an External Quality Control Scheme. *Journal of Laboratory Medicine and Quality Assurance* 2003;25(83):549-53.
6. Ina S. Timan, Riiana Dewi, Witono Santoso, Diana Aulia, MIMI Miranti. Platelet Count: Performance of some Hematology Analyzers. Proceeding of the 5th Colloquium of Asian Network for Clinical Laboratory Standardization and harmonization (ANCL5). Royal River Hotel, 17-19 December 2003, Bangkok, Thailand 2003;53:21-25.
7. Ina S. Timan. Penyakit Von Willebrand Dalam : Marzuki Suryatmadja (Editor). Pendidikan berkesinambungan Bag. Pat.Klinik 2003. Bag. Pat. Klinik FKUI. ISBN 979-97132-1-8. Jakarta 2003;189-205.
8. Ina S. Timan, Diana Aulia, Enry. The use of Ethanol Gelatin test to screen the activation of coagulation and disseminated intravascular coagulation. International Proceeding 22nd World Congress of Pathology and Laboratory medicine. Editor Ae Ja Park. World Association of Societies of pathology and Laboratory Medicine (WASPLM). ISBN 88-7587-019-5. Medimed International Proceedings. 1st ed. Bologna, Italy, 2004: 211-215.
9. Timan IS, Tatumi N, Aulia D, Wangsaputra E. Comparison of haemoglobinometry by WHO Haemoglobin Colour Scale and copper sulphate against haemoglobin-cyanide reference method. *Clin Lab Haematol* 2004; 4: 253-8.
10. Ina S. Timan, Regina AHM, Diana Aulia, MIMI Miranti, Agustine Matanula, Alan Tumbelaka, Meiharti Bahar. Some hematological aspect of Dengue hemorrhagic fever in correlation with blood coagulability and viscosity. Presented in Xth Congress

International Society of Hematology, Asian Pacific Division, Nagoya Japan, Sept. 1-4, 2004.

11. Ina S. Timan, Agus Firmansyah, Siti B. Kresno, Diana Aulia, Moeslichan MZ. Use of Heparin in thalassemia – what's new? Presented in Asian Network QC meeting 2006, Kuala Lumpur, Malaysia.
12. Ina S. Timan, Agus Firmansyah. Heparin in normal and anemic children. *Journal of Laboratory Medicine & Quality Assurance* 2006;28;53:12-5.
13. Ina S. Timan, Diana Aulia, Rudi Wirawan, Witono Santoso. Hematology Quality Control Assessment Scheme. A way to improve laboratory performance. *Journal of Laboratory Medicine & Quality Assurance* 2006;28;53:1-6.
14. Ina S. Timan, Agus Firmansyah, Siti B. Kresno, Diana Aulia, Moeslichan MZ, Daldiyono H. Pepsinogen II levels in normal subjects and secondary hemochromatosis. (Preliminary report). Presented in the 1st China-Indonesia Joint International Symposium on Hepatobiliary Medicine and Surgery. Bali, 24-26 Agustus 2007.
15. Ina S. Timan, Agus Firmansyah, Siti B. Kresno, Diana Aulia, Moeslichan MZ, Djajadiman Gatot, Daldiyono H. Expression of pro-Heparin in Secondary Hemochromatosis. Presented in the 1st China-Indonesia Joint International Symposium on Hepatobiliary Medicine and Surgery. Bali, 23-25 September 2007.
16. Ina S. Timan, Diana Aulia, Witono Santoso. Country Report : External Quality Assurance Scheme in Indonesia. Result analysis. Dipresentasikan pada 8th ANCLIS meeting, Manila, 25-27 Agustus 2007.
17. Ina S. Timan, Diana Aulia, Rudi Wirawan*, Witono Santoso. Preparation of Local HCN standard as a tool to improve the performance for hemoglobin determination in small laboratories. Dipresentasikan pada 8th ANCLIS meeting, Manila, 25-27 September 2007.
18. Ina S. Timan, Diana Aulia, Agus Firmansyah, Daldiyono H, Nani Dharmasatiawati, Yadiana Harshap. Quantitative determination of urine lactose and lactulose in healthy adults by HPLC for determination of lactase activity and intestinal integrity. Dipresentasikan pada 8th ANCLIS meeting, Manila, 25-27 September 2007.