

FORUM DIAGNOSTICUM

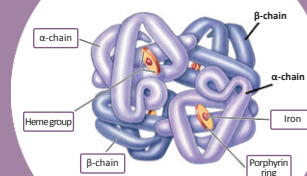
PRODIA DIAGNOSTICS EDUCATIONAL SERVICES

ISSN 0854-7173 | No. 3/2023



PENTINGNYA MEMAHAMI VARIAN HB DAN PENGARUHNYA PADA PEMERIKSAAN HbA1C DAN KONSENTRASI HEMOGLOBIN

Bena Zaira



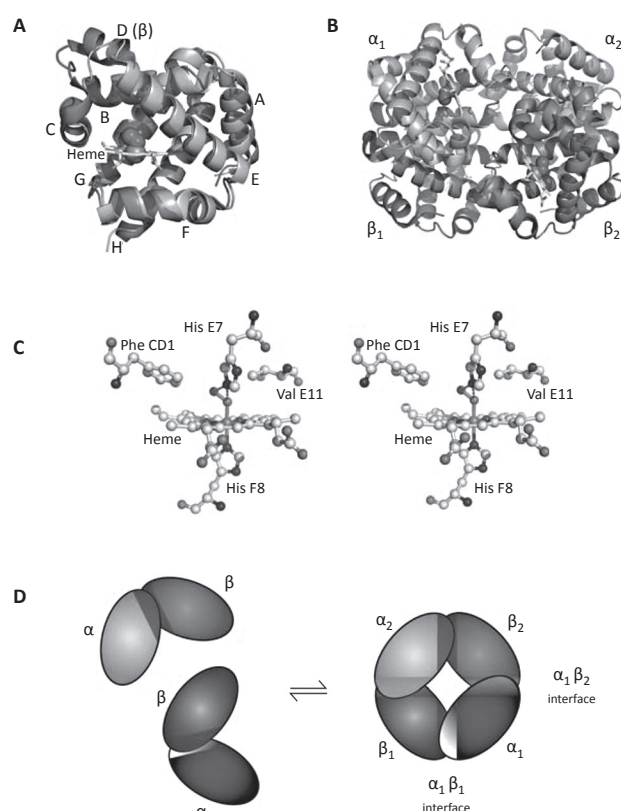
PENDAHULUAN

Sampai saat ini diketahui terdapat lebih dari 1000 varian hemoglobin manusia. Variasi Hb ini dapat disebabkan karena variasi genetik pada gen HBA1, HBA2, HBB, HBG1, HBG2 dan HBD. Varian ini menyebabkan perbedaan struktur hemoglobin dan sifat biokimia dengan efek fisiologis mulai dari yang tidak signifikan hingga yang parah. Selain itu varian Hb ini juga mempengaruhi hasil pemeriksaan laboratorium, hal ini sangat penting untuk dipahami agar dapat membuat interpretasi yang sesuai dan memilih jenis pemeriksaan atau metode yang tepat (1,2).

STRUKTUR HB

Hemoglobin terdiri dari empat subunit, masing-masing memiliki satu rantai polipeptida dan satu gugus heme. Hemoglobin adalah protein tetramerik, dengan masing-masing dua rantai α dan dua rantai β globin yang terikat

secara ionik, non-kovalen ke daerah kontak hidrofobik dan kelompok heme, serta terdiri dari cincin porfirin dengan pusat atom besi untuk afinitas oksigen. Grup heme berada di saku berbentuk V dan dikelilingi struktur tersier asam amino hidrofobik untuk stabilitas. Konformasi molekul hemoglobin tersebut berubah dengan oksigenasi pada keadaan R (*rest*), dan deoksigenasi pada keadaan T (*tense*). Efek alosterik ini bertanggung jawab terhadap kurva pengikatan oksigen-hemoglobin sigmoidal dari hemoglobin. Senyawa 2,3 bifosfoglisarat intraeritrositik (2,3-BPG) berperan sebagai efektor alosterik, berfungsi untuk mereduksi afinitas oksigen hemoglobin dengan mengikat deoksi hemoglobin melalui jembatan garam sehingga memfasilitasi pelepasan oksigen sehingga tidak dapat mengikat oksihemoglobin. Kemampuan ini diperlukan untuk memastikan bahwa hemoglobin dapat menyerap oksigen di paru-paru dan melepaskannya ke dalam jaringan. Efek Bohr menggambarkan kurva saturasi oksigen hemoglobin sebagai fungsi dari nilai pH dan tekanan parsial oksigen, dan menyebabkan peningkatan pelepasan karbon dioksida dengan adanya oksigen yang tinggi konsentrasi (paru-paru), serta pelepasan oksigen dan memfasilitasi penyerapan karbon dioksida di perifer (1,3,4).



Gambar 1. Gambaran Struktur Hemoglobin (1).

Pada gambaran struktur Hb gambar 1A, Subunit α dan β , Hb telah mempertahankan lipatan α -heliks. Heliks diberi label A - H dari terminal amino. Subunit α tidak memiliki heliks D. Struktur kuaterner keadaan R (gambar 1B) dengan afinitas O_2 yang tinggi dari Hb dengan O_2 terikat di keempat lokasi heme (protoporphyrin-IX) dengan atom besi pusat. Diagram stereo (*wall-eye*) pada gambar 1C dari kantong heme B menunjukkan histidin proksimal (F8) dan distal (E7) dan residu terpilih di kantong heme distal yang memengaruhi pengikatan ligan dan autoksidasi. Tetramer Hb (gambar 1D) dirakit dari dua dimer $\alpha\beta$ identik yang didalam tetramer tersebut, setiap subunit melakukan kontak dengan rantai yang tidak sama melalui antarmuka dimerisasi afinitas tinggi $\alpha_1\beta_1$ dan antarmuka afinitas rendah $\alpha_1\beta_2$ dimer-tetramer (1).

Di dalam tetramer Hb, setiap subunit globin mengikat rantai yang tidak serupa melalui dua *interface* berbeda, disebut $\alpha_1\beta_1$ dan $\alpha_1\beta_2$ (Gambar 1D, 2A). Subunit globin individu membentuk dimer melalui interaksi afinitas $\alpha_1\beta_1$ yang sangat tinggi. Monomer rantai globin relatif tidak stabil dibandingkan dengan dimer, dengan kecenderungan membentuk endapan intraseluler yang merusak eritrosit sehingga menyebabkan anemia hemolitik. Dengan demikian, mutasi yang mengganggu interaksi $\alpha_1\beta_1$ dapat menyebabkan eritrotoksisitas dengan mendukung akumulasi subunit monomer (Gambar 2C). Interaksi $\alpha_1\beta_2$, yang afinitasnya lebih rendah, memediasi tetramerisasi. Pengikatan oksigen mengacaukan interaksi $\alpha_1\beta_2$, menyebabkan transisi struktur kuaterner dari keadaan “T” (tegang, afinitas rendah,

terdeoksigenasi) ke keadaan “R” (santai, afinitas tinggi, teroksigenasi), yang memfasilitasi pengikatan O_2 ke subunit tambahan (Gambar 2A). Proses ini menyebabkan pengikatan O_2 kooperatif, yang diilustrasikan dengan bentuk sigmoidal yang khas dari kurva kesetimbangan Hb- O_2 (Gambar 2B). Kooperativitas memungkinkan pelepasan O_2 secara maksimal pada penurunan tekanan O_2 yang relatif kecil. Mutasi dalam wilayah interaksi $\alpha_1\beta_2$ dapat mengubah sifat fungsional Hb, terutama mengganggu karakteristik pengikatan O_2 (Gambar 2C, Tabel 1)(1).

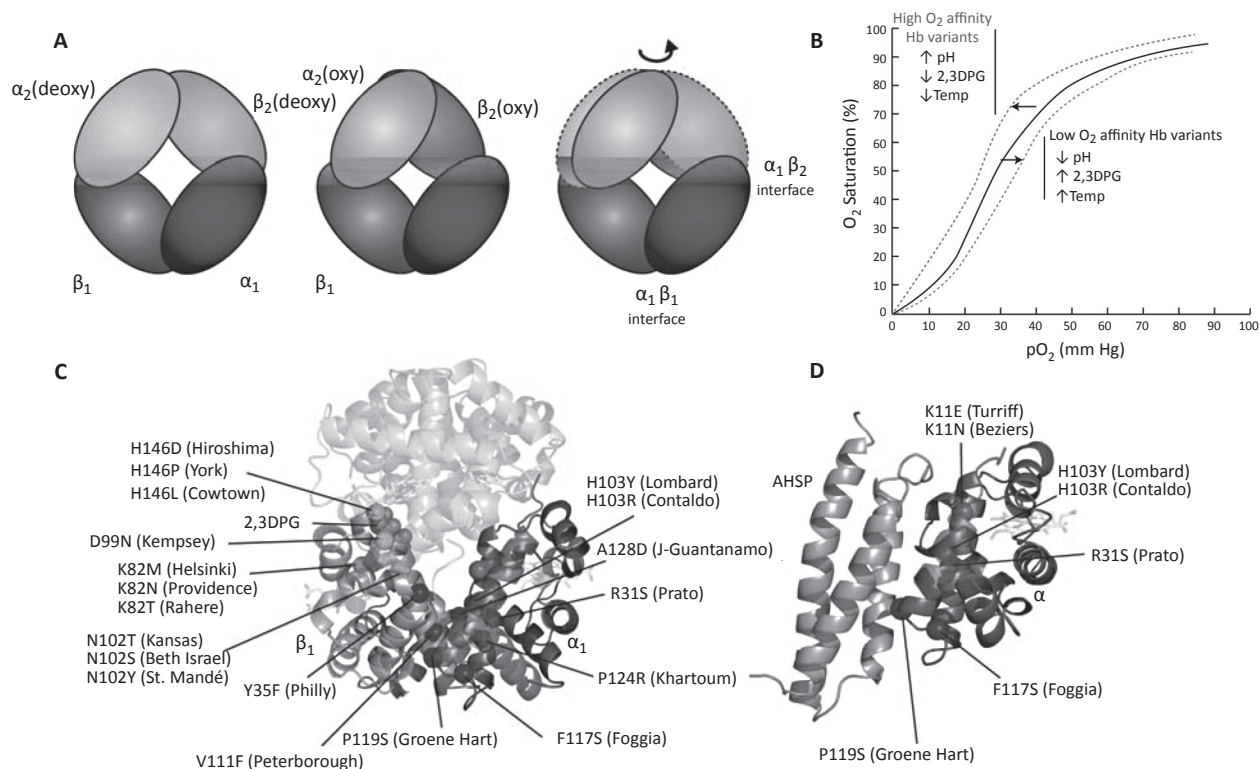
MUTASI PADA HEMOGLOBIN

Mutasi adalah perubahan permanen dalam urutan genomik DNA dan merupakan sumber dari variasi genetik. Mutasi yang memiliki efek buruk pada fenotipe dan menyebabkan kondisi penyakit menjadi perhatian utama genetika medis. Sebagian besar mutasi diwariskan dari satu generasi ke generasi berikutnya, tetapi beberapa muncul secara *de novo* sebagai mutasi baru. Mutasi tersebut kemudian dapat diwariskan ke generasi mendatang, mengikuti aturan pewarisan monogenik. Sebagian besar mutasi baru terjadi secara spontan, tanpa sebab yang jelas, tetapi terjadi secara teratur. Namun, agen mutagenik tertentu, baik berupa bahan kimia, virus atau radiasi, juga dapat menyebabkan mutasi. Ada kemungkinan agen lingkungan yang tidak terdeteksi dapat menyebabkan mutasi spontan (5).

Ada beberapa jenis mutasi, mulai dari yang mempengaruhi hanya satu pasangan basa hingga yang melibatkan seluruh kromosom atau segmen kromosom. Berikut merupakan beberapa jenis mutasi terutama pada hemoglobin:

A. Mutasi titik

Mutasi titik atau substitusi pasangan basa tunggal adalah perubahan dalam satu nukleotida. Mutasi titik yang terjadi pada ekson gen penyandi menghasilkan perubahan protein yang ditranskripsi. Jika mutasi titik terjadi di dalam intron gen penyandi tidak menyebabkan perubahan apa pun pada pesan yang dikodekan, tetapi dapat menyebabkan cacat penyambungan RNA sehingga memengaruhi protein yang dihasilkan. Mutasi titik dapat memengaruhi daerah non-coding lainnya, seperti urutan promotor, yang mengakibatkan kegagalan transkripsi protein. Mutasi titik juga dapat mempengaruhi urutan pengaturan, mengakibatkan penurunan translasi dan penurunan produk gen. Mutasi titik dapat terjadi secara acak di region DNA non-coding. Mutasi seperti itu sangat umum dan biasanya disebut polimorfisme nukleotida tunggal (SNP). Meskipun tidak memiliki efek pada fenotipe, SNP sangat penting, karena menjadi penanda genetik yang berguna untuk identifikasi individu dan dalam penentuan paternitas (5).



Gambar 2. Struktur Hb (1).

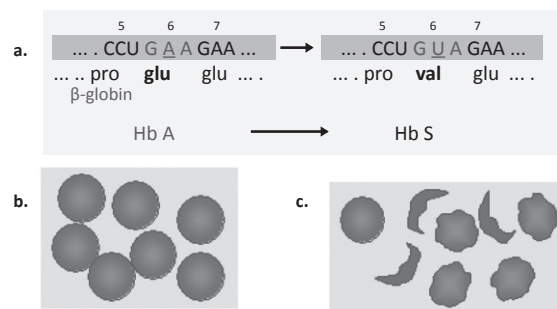
Berikut ini adalah beberapa contoh mutasi titik yang terjadi di dalam ekson gen.

1. Mutasi titik menyebabkan anemia sel sabit

Penyakit sel sabit atau *sickle cell disease* (SCD) adalah penyakit mendelian umum yang disebabkan oleh mutasi pada subunit β -globin hemoglobin. β -globin merupakan komponen utama hemoglobin dewasa (HbA). Substitusi asam amino tunggal menghasilkan jenis hemoglobin yang disebut HbS, yang memiliki sifat berbeda dari HbA normal. Homozigositas untuk hemoglobin sabit menghasilkan serangkaian perubahan seluler pada morfologi dan fungsi sel darah merah yang mempersingkat masa hidup sel darah merah dan menyebabkan oklusi vaskular oleh eritrosit sabit dengan akibat kerusakan jaringan pada organ target. Anemia hemolitik kronis juga merupakan ciri penyakit sel sabit yang kemungkinan terkait dengan perkembangan vaskulopati progresif, hipertensi pulmonal, ulserasi kaki kulit, priapismus dan kemungkinan stroke. Pada akhirnya, kerusakan organ target menyebabkan disfungsi organ dan kematian dini, biasanya pada usia sekitar 50 tahun. Anemia sel sabit adalah hasil mutasi titik pada kodon 6 gen β -globin yang mengakibatkan substitusi asam amino asam glutamat oleh valin (Gambar 3). Dalam kondisi tekanan oksigen rendah, seperti saat olahraga atau di atmosfer yang mengandung konsentrasi oksigen rendah, terjadi perubahan berikut:

- Hemoglobin menggumpal membentuk polimer berbentuk batang yang tidak larut;
- Sel darah merah menjadi terdistorsi dan berbentuk sabit (Gambar 3);

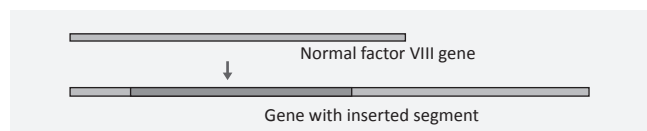
- Sel berbentuk sabit mudah pecah menyebabkan anemia hemolitik;
- Sel-sel berbentuk sabit cenderung memblokir kapiler yang mengganggu aliran darah ke berbagai organ (5,6,7)



Gambar 3. Mutasi Titik pada Anemia Sel Sabit (5).

Pada gambar 3.a terlihat mutasi titik pada kodon nomor 6 pada hasil gen β -globin pada substitusi bilangan asam amino glutamin dengan valin dan pembentukan hemoglobin S (HbS). Kemudian pada gambar 3.b, sel darah merah pada apusan darah normal mengandung HbA. Sedangkan pada gambar 3.c, sel krenasi dan sel darah merah berbentuk sabit pada anemia sel sabit (5).

tidak terjadi karena kekurangan faktor pembekuan VIII. Dalam kebanyakan kasus, mutasi insersi adalah hasil penyisipan segmen besar, yang terdiri dari sekitar 3800 bp, di wilayah pengkodean faktor VIII. Hal tersebut menyebabkan inaktivasi total protein. Pada gambar 8 terlihat insersi dari segmen 3.8 Kb pada gen faktor VIII merupakan mutasi yang paling umum pada hemofilia A (5)



Gambar 8. Mutasi Insersi (5).

PENGARUH VARIASI HB DAN KONDISI KLINIS

Mutasi gen globin yang memengaruhi hemoglobin (Hb) sebagai pembawa oksigen darah (O_2) utama umum terjadi, memengaruhi sekitar 7% populasi dunia. Mutasi ini secara luas dibagi menjadi mutasi yang merusak produksi subunit protein globin (thalassemia) dan mutasi yang menghasilkan protein globin abnormal secara struktural (varian Hb). Varien Hb terdiri dari mutasi missense yang menyebabkan substitusi asam amino tunggal dalam protein globin, menghasilkan tetramer Hb yang abnormal atau “varian”. Terkadang varian Hb dikaitkan dengan penghapusan, substitusi asam amino multipel, mutasi antiterminasi, dan perubahan pemrosesan pasca translasi, seperti yang terangkum pada table 1 yang menggambarkan berbagai variasi Hb, mekanisme molekular dan fenotipe klinis yang terjadi (1,9,11).

Beberapa Varian Hb secara klinis tidak berbahaya, namun menghasilkan perubahan warna kulit yang jelas. Sebagai contoh, mutasi yang meningkatkan afinitas Hb- O_2 biasanya merangsang proses eritropoietik dengan menghambat pengantaran O_2 ke jaringan, menyebabkan eritrositosis yang berhubungan dengan kulit kemerahan (15). Mutasi yang mengurangi afinitas O_2 menghasilkan rona kebiruan pada kulit (sianosis) yang disebabkan oleh tingkat deoxyHb yang sangat tinggi. Mutasi yang membantu oksidasi besi Hb menjadi bentuk met (M-Hbs), juga menyebabkan kulit berwarna biru, sedangkan darahnya sendiri tampak berwarna coklat. Studi dari satu keluarga dengan sianosis kongenital menggambarkan hemoglobinopati pertama yang diketahui, disebabkan oleh varian Hb-M Saskatoon. Selain itu terdapat juga varian M-Hb Iwate, yang menyebabkan “darah hitam” atau “nigremia hereditas” yang pertama kali ditemukan lebih dari 200 tahun yang lalu di Jepang (13,14,15). Banyak varian Hb yang memengaruhi warna kulit tidak merusak secara klinis. Namun, kondisi ini dapat menjadi masalah yang lebih mengancam jiwa seperti gangguan kardiopulmoner dan mieloproliferatif yang harus disingkirkan. Dengan demikian, pasien dengan varian Hb sianotik atau polisitemik dapat keliru menjalani prosedur medis yang tidak perlu dan berpotensi berbahaya (16).

Banyak varian Hb yang mudah dipastikan melalui pemeriksaan fisik dan/atau pemeriksaan laboratorium rutin, yang menjelaskan mengapa begitu banyak yang ditemukan. Terkadang, beberapa varian diidentifikasi melalui evaluasi pasien sakit dengan anemia berat atau sianosis yang signifikan secara klinis. Banyak substitusi asam amino mengubah muatan permukaan dan kemudian dideteksi dengan elektroforesis atau kromatografi, teknik yang secara rutin dilakukan pada tes neonatus terutama Amerika Utara dan Eropa. Menariknya, beberapa varian Hb bermigrasi mirip dengan HbA1c, bentuk Hb glikosilasi yang mencerminkan kontrol konsentrasi glukosa darah jangka panjang pada pasien diabetes. Dengan cara ini, substitusi asam amino Hb spesifik dapat secara artifisial meningkatkan pengukuran HbA1c dan mengganggu manajemen diabetes (17).

PENGARUH VARIAN HB PADA PEMERIKSAAN HbA1C

Pada tulisan diatas telah dibahas mengenai pengaruh mutasi atau varian Hb pada berbagai kondisi penyakit. Namun, ternyata mutasi atau varian Hb juga memiliki pengaruh pada hasil pemeriksaan laboratorium diantaranya HbA1c. Pada tulisan ini juga akan membahas mengenai pengaruh varian Hb terhadap hasil kedua pemeriksaan laboratorium yang sangat terpengaruh pada kondisi Hb tersebut.

Efek varian Hb pada interpretasi Hb A1c.

Konsentrasi HbA1c sangat berkorelasi dengan konsentrasi glukosa darah dan merupakan penanda yang paling banyak digunakan untuk memantau kontrol glikemik. Terdapat berbagai studi yang menyatakan bahwa konsentrasi HbA1c merupakan prediktor kuat untuk DM onset baru sehingga American Diabetes Association memasukkan penggunaan pengujian HbA1c yang berdiri sendiri untuk mendiagnosis DM dan mengidentifikasi pra-DM dalam pedoman praktik klinisnya. HbA1c sendiri dapat diukur menggunakan berbagai tes, yang masing-masing dapat dipengaruhi oleh beberapa faktor yang menyebabkan hasil yang menyimpang (18). Faktor-faktor yang mempengaruhi pemanfaatan klinis Hb A1c dengan adanya varian Hb mencakup gangguan analitik dan interpretasi klinis dari hasil. Hemoglobinopati dapat mempengaruhi nilai HbA1c dengan 3 cara: (1) Dengan mempengaruhi pengikatan glukosa ke Hb, (2) mempengaruhi puncak kromatografi pengukuran, dan (3) meningkatkan risiko hemolisis dan karenanya mengurangi masa hidup sel darah merah (19,20).

Berdasarkan data pengujian dari beberapa literatur, hampir 30 metode yang secara komersial tersedia untuk menentukan konsentrasi Hb terglisasi. Metode tersebut termasuk pengukuran berdasarkan muatan (kromatografi penukar ion) dan pengukuran berdasarkan struktur (kromatografi afinitas dan immunoassay). Pada daerah di mana terdapat varian Hb, penting untuk selalu

Tabel 1. Variasi Hb serta substitusi asam amino, mekanisme molekular dan fenotip klinisnya

Name	Globin site (fold)	Amino acid substitution	Molecular mechanism	Clinical phenotype	Other biochemical and laboratory findings
Unstable Mutants					
Brockton	β 138 (H16)	Ala > Pro	Altered secondary structure	Hemolytic anemia, reticulocytosis	
Philly	β 35 (C1)	Tyr > Phe	Altered α 1 β 1 interface	Hemolytic anemia, reticulocytosis	Decreased cooperativity, increased oxygen affinity
Peterborough	β 111 (G13)	Val > Phe	Altered α 1 β 1 interface	Hemolytic anemia, reticulocytosis	Decreased oxygen affinity
Stanmore	β 111 (G13)	Val > Ala	Altered α 1 β 1 interface	Hemolytic anemia	Decreased oxygen affinity
J-Guantanamo	β 128 (H6)	Ala > Asp	Altered α 1 β 1 interface	Hemolytic anemia	Target cells
Khartoum	β 124 (H2)	Pro > Arg	Altered α 1 β 1 interface	Normal	
Prato	α 1 or α 2 31 (B12)	Arg > Ser	Altered α 1 β 1 interface	Anisocytosis, hypochromia	Mildly unstable in isopropanol
Lombard	α 2 103 (G10)	His > Tyr	Altered α 1 β 1 interface	Anemia	
Contaldo	α 1 or α 2 103 (G10)	His > Arg	Altered α 1 β 1 interface	Hemolytic anemia	
Foggia	α 2 117 (GH5)	Phe > Ser	Altered α 1 β 1 interface	Microcytosis	Rapidly degraded α chains
Groene Hart	α 1 119 (H2)	Pro > Ser	Altered α 1 β 1 interface, disrupted AHSP binding	Hemolytic anemia, microcytosis	
Turriff	α 1 or α 2 99 (G6)	Lys > Glu	Altered α 1 β 1 interface, disrupted AHSP binding	Normal	Comigrates with HbA _{1C} , rapidly degraded α chains
Beziers	α 1 99 (G6)	Lys > Asn	Altered α 1 β 1 interface, disrupted AHSP binding	Normal	Comigrates with HbA _{1C}
Hirosaki	α 2 43 (CE1)	Phe > Leu	Altered heme pocket	Heinz body hemolytic anemia	Hyperunstable
Terre Haute	β 106 (G8)	Leu > Arg	Altered heme pocket	Heinz body hemolytic anemia, dominant inclusion body thalassemia	Hyperunstable
High Affinity Variants					
Kempsey	β 99 (G1)	Asp > Asn	Unstable T state	Erythrocytosis	Decreased cooperativity
Hiroshima	β 146 (HC3)	His > Asp	Mutated Bohr proton donor	Erythrocytosis	Decreased cooperativity, decreased Bohr effect
York	β 146 (HC3)	His > Pro	Mutated Bohr proton donor	Erythrocytosis	Decreased cooperativity, decreased Bohr effect
Cowtown	β 146 (HC3)	His > Leu	Mutated Bohr proton donor	Erythrocytosis	Decreased Bohr effect

Name	Globin site (fold)	Amino acid substitution	Molecular mechanism	Clinical phenotype	Other biochemical and laboratory findings
Rahere	β 82 (EF6)	Lys > Thr	Altered 2,3DPG binding site	Erythrocytosis	
Providence	β 82 (EF6)	Lys > Asn	Altered 2,3DPG binding site	Erythrocytosis	Low oxygen affinity
Helsinki	β 82 (EF6)	Lys > Met	Altered 2,3DPG binding site	Erythrocytosis	Decreased Bohr Effect
Low Affinity Variants					
Kansas	β 102 (G4)	Asn > Thr	Unstable R state	Cyanosis	Decreased cooperativity
Beth Israel	β 102 (G4)	Asn > Ser	Unstable R state	Cyanosis	Decreased cooperativity
St. Mandé	β 102 (G4)	Asn > Tyr	Unstable R state	Cyanosis	
Methemoglobin Variants					
M-Iwate	α 1 or α 2 (F8)	His > Tyr	Oxidized heme	Pseudocyanosis (Methemoglobinemia)	Abnormal visible spectrum
M-Saskatoon	β 63 (E7)	His > Tyr	Oxidized heme	Pseudocyanosis (Methemoglobinemia)	Abnormal visible spectrum
Globin Chain Elongation Variants					
Constant Spring	α 2 142 (HC3)	Stop > Gln	Antitermination mutant	Microcytosis	Decreased mRNA stability
Cranston	β 145 (HC3)	+CT	Frameshift, elongated globin	Hemolytic anemia	Increased oxygen affinity, decreased cooperativity
Variants with Multiple Effects					
HbE	β 26 (B8)	Glu > Lys	Unstable, reduced synthesis	Microcytosis	
Bruxelles	β 41 (C7) or β 42 (CD1)	Phe > O	Altered heme pocket	Hemolytic anemia, cyanosis, splenomegaly, reticulocytosis	Heinz bodies, decreased cooperativity
Warsaw	β 42 (CD1)	Phe > Val	Altered heme pocket	Hemolytic anemia, cyanosis	Heinz bodies, decreased cooperativity
Hammersmith	β 42 (CD1)	Phe > Ser	Altered heme pocket	Hemolytic anemia, cyanosis	Heinz bodies, decreased cooperativity
Buccaresti-Louisville	β 42 (CD1)	Phe > Leu	Altered heme pocket	Hemolytic anemia, cyanosis	Heinz bodies, decreased cooperativity
Zurich	β 63 (E7)	His > Arg	Altered heme pocket	Normal, but hypersensitive to oxidative stress	Decreased cooperativity, increased oxygen affinity, increased CO affinity
Jamaica Plain	β 6 (A3) and β 68 (E12)	Glu > Val and Leu > Phe	Altered secondary structure	Hemolytic anemia, cyanosis, splenomegaly, splenic sequestration	Unstable, Heinz bodies, sickle cell phenotype, decreased oxygen affinity

Name	Globin site (fold)	Amino acid substitution	Molecular mechanism	Clinical phenotype	Other biochemical and laboratory findings
Quebec-Chori	β87 (F3)	Thr > Ile	Altered interaction with Hbs polymer	Normal	Promotes HbS polymerization
D-Ibadan	β87 (F3)	Thr > Lys	Altered interaction with Hbs polymer	Normal	Inhibits HbS polymerization
Bristol-Alesha	β67 (E11)	Val > Met	Altered heme pocket	Hemolytic anemia, reticulocytosis	Heinz bodies, decreased cooperativity, decreased Bohr effect, decreased oxygen affinity
Tom River	γ67 (E11)	Val > Met	Altered heme pocket	Anemia, cyanosis	Unstable, low oxygen affinity

dipertimbangkan pemilihan metode HbA1c secara hati-hati dengan meninjau instruksi produk dari produsen untuk mengurangi kemungkinan ketidakakuratan pengukuran ini (21).

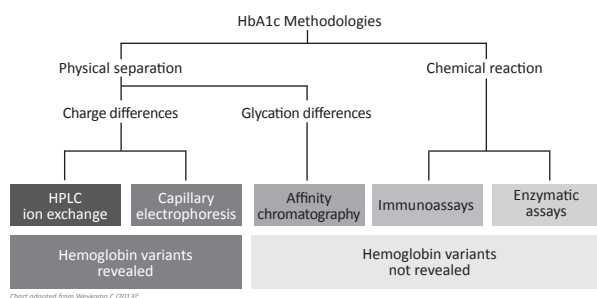
Kemunculan varian Hb memiliki efek yang lebih rendah ketika metode immunoassay digunakan untuk pengukuran HbA1c. Namun, metode *High Performane Liquid Chromatography* (HPLC) untuk kuantifikasi HbA1c memisahkan varian Hb berdasarkan perbedaan muatan dan diketahui rentan terhadap interferensi dari varian Hb. Kira-kira 1175 varian Hb telah diidentifikasi hingga saat ini dengan beberapa diketahui bercampur dengan HbA0. Kegagalan untuk memisahkan varian komponen Hb dari HbA1c dan/atau HbA0 dapat menyebabkan masalah dengan integrasi puncak dan menyebabkan hasil HbA1c yang tidak normal. Konsentrasi HbA1c yang tidak akurat dapat diamati ketika varian Hb, atau turunan terglisasinya, tidak dapat dipisahkan dari HbA atau HbA1c. Kehadiran varian Hb yang relatif umum sering mudah dikenali saat menggunakan metode HPLC dengan adanya puncak tambahan dalam kromatogram. Namun, studi lebih lanjut diperlukan untuk mengkarakterisasi varian Hb (13,23). Untuk memastikan hasil HbA1c yang akurat, pemeriksaan laboratorium harus mengetahui keberadaan varian hemoglobin dalam sampel, dengan pemilihan metode

yang memiliki kemampuan untuk mengetahui varian hemoglobin yang berpengaruh terhadap hasil HbA1c dapat dilihat pada Gambar 9, terutama untuk mengetahui apakah pasien memiliki varian hemoglobin serta pengaruh pada hasil HbA1c jika terdapat varian Hb (24,25).

Penggunaan Glycated Albumin (GA) Dalam Kondisi varian Hb yang Mempengaruhi HbA1c

Dalam praktik klinis, HbA1c digunakan sebagai pemeriksaan untuk pemantauan glukosa pada DM dan juga merupakan tes diagnostik. Namun, ada beberapa kelemahan dan kontroversi yang membatasi penggunaan HbA1c. Kelemahan tersebut terkait dengan situasi klinis tertentu atau dengan metode analisis yang digunakan. Kondisi ini dapat menyebabkan hasil palsu untuk HbA1c yang tidak benar-benar berkorelasi dengan rata-rata glikemia, dan secara langsung mempengaruhi identifikasi dan pengelolaan pasien dengan DM. Dalam kasus tersebut, Glycated Albumin (GA) dapat menjadi alternatif yang memadai untuk HbA1c dalam kontrol glikemik (26).

GA dapat digunakan sebagai alternatif untuk HbA1c dalam setiap perubahan hematologis yang mengganggu waktu paruh sel darah merah dan/atau struktur atau karakteristik kimia Hb. Anemia hemolitik dan episode perdarahan mengurangi nilai atau konsentrasi HbA1c, sedangkan anemia defisiensi besi, talasemia, dan hemoglobinopati dapat meningkatkan hasil HbA1c. Selama periode kehamilan, jenis Hb utama dalam sel darah merah adalah Hb janin (HbF), yang secara bertahap digantikan oleh HbA setelah lahir. Karena HbA1C adalah produk glikasi dari HbA, bayi baru lahir cenderung mengalami penurunan konsentrasi. Namun, interferensi dengan pengukuran HbA1c bergantung pada metode. Beberapa metodologi analitik mungkin tidak terpengaruh oleh gangguan umum seperti varian hemoglobin. The National Glycohemoglobin Standardization Program (NGSP) memberikan informasi terperinci (Tabel 2) mengenai gangguan dalam pengujian HbA1c oleh produsen (27).



Gambar 9. Metode Pemeriksaan HbA1c [24]

Tabel 2. Interferensi Varian Heterozigot S, C, D, E, dan Peningkatan HbF dengan Metode HbA1c Tertentu [22]

Metode (Alfabetikal)	Interferensi (Yes/No)					
	HbC Trait	HbS Trait	HbE Trait	HbD Trait	Elevated HbF	Carb Hb
Abbott Architect c Enzymatic	NO	NO	NO	NO	-	-
Alere Nycocard	NO	NO	*	*	**	-
Alere Afinion	NO	NO	NO	NO	**	-
Arkray ADAMS A1c HA-8180V Variant Mode (Menarini) (*Denotes software version EU 1.41)	NO	NO	YES / NO	YES / NO	NO <30%	-
Arkray ADAMS A1c HA-8180T (software version EU 1.41)	NO	NO	NO	NO	-	-
Arkray ADAMS A1c HA-8190V Variant Mode	NO	NO	NO	NO	NO	-
Arkray The Lab 001 (POC)	NO	NO	NO	NO	No <42%	-
Beckman HbA1c Advanced B93009 Online Application on DxC 700 AU	NO	NO	NO	NO	-	-
Beckman HbA1c Advanced B00389 Manual Application on DxC 700 AU	NO	NO	NO	NO	-	-
Beckman HbA1c on Unicel DxC	NO	NO	NO	NO	-	-
Bio-Rad D-100	NO	NO	NO	NO	NO ≤20%	-
Bio-Rad D-10 (short Program)	NO	NO	NO	NO	-	NO
Bio-Rad Variant II A1c (NU)	NO	NO	NO	NO	No <10%	NO
Bio-Rad Variant II Turbo (270-2415/2417)	NO	NO	YES	YES	No <5%	NO
Bio-Rad Variant II Turbo 2.0	NO	NO	NO	YES / NO	No <25%	NO
Diazyme Direct Enzymatic HbA1c	NO	NO	NO	NO	-	NO
JEOL BM Test HbA1c on JCA-BM 6010/C	NO	NO	NO	NO	No <15%	-
Menarini HA-8160 (Diabetes Mode)	NO	NO	YES	YES	-	NO
Menarini HA-8160 (Thalassemia Mode)	-	-	NO	HbA1c not quantified	-	-
Ortho-Clinical Vitros	NO	NO	NO	NO	**	-
Pointe Scientific Hemoglobin A1c	NO	NO	NO	NO	**	-
Polymer Tech Systems A1cNow	YES	YES	NO	NO	**	-
Roche Cobas Integra Gen2	NO	NO	NO	NO	**	NO
Roche Tina-quant II on Hitachi	NO	NO	NO	NO	**	NO
Roche Cobas c513	NO	NO	NO	NO	**	-
Roche b 101						
Sebia Capillarys 2 Flex Piercing	NO	NO	NO	NO	NO ≤15%, <23%	NO
Sebia Capillarys 3 Tera	NO	NO	NO	NO	NO <23%	NO
Siemens Advia HbA1c (original version)	YES	YES	*	*	**	-
Siemens Advia A1c (new version)	NO	NO	NO	NO	**	-
Siemens Atellica A1c	NO	NO	NO	NO	**	-
Siemens DCA 2000/DCA Vantage	NO	NO	NO	NO	NO <10%	NO
Siemens Dimension	NO	NO	NO	NO	**	-
Tosoh G7 Variant Mode	YES	NO	YES	NO	No ≤30%	NO
Tosoh G8 Variant Mode (*Denotes software ver. 5.24 & 5.28))	NO	NO	YES / NO	YES / NO	No ≤30%	NO
Tosoh GX (orig. version)	YES	YES	YES	YES	-	-
Tosoh GX V1.22	YES	YES	NO	YES	-	-
Tosoh GX V1.24	NO	NO	NO	NO	-	-
Tosoh G11 Variant Mode (orig. version)	YES	NO	NO	NO	-	-
Tosoh G11 Variant Mode V3.06 (*Denotes software ver. 3.07)	NO	NO	NO	YES / NO	-	-
Trinity (Primus) Boronate Affinity HPLC	NO	NO	NO	NO	NO <15%	NO

1. (*) Dengan tidak adanya data metode spesifik, secara umum dapat diasumsikan bahwa metode immunoassay tidak memiliki interferensi yang signifikan secara klinis dari HbE dan HbD karena substitusi E dan D jauh dari ujung N rantai beta hemoglobin
2. (**) Dengan tidak adanya data metode khusus, secara umum dapat diasumsikan bahwa baik metode immunoassay dan afinitas boronat menunjukkan interferensi dari tingkat HbF di atas ~10-15% (20, 43).
3. (#) Ketika sifat HbE terdeteksi tidak ada gangguan yang signifikan. Dalam kasus di mana keberadaan sifat HbE tidak terdeteksi, hasil HbA1c diturunkan secara artifisial.
4. (-) Tanda tersebut menyatakan metode belum dievaluasi
5. (Yes/No) menunjukkan bahwa ada data yang bertentangan dalam literatur.

Efek varian Hb pada interpretasi Konsentrasi Hb

Kelainan terkait Hb disebabkan oleh mutasi dan/atau delesi pada gen α - atau β -globin yang menghasilkan defek intrinsik sel darah merah yang dapat mengakibatkan anemia karena masa hidup eritrosit yang lebih pendek, hemolisis, dan patologi sistemik lainnya tergantung pada keberadaan mutasi spesifiknya, pengubah genetik, dan faktor lainnya (28,29). Penyakit ini dapat dikelompokkan ke dalam varian struktural Hb yang menghasilkan molekul dengan sifat abnormal, seperti peningkatan polimerisasi, perubahan kelarutan atau afinitas pengikatan oksigen (30), dan sindrom talasemia yang diakibatkan oleh gangguan produksi rantai α atau β dari Hb (29). Talasemia α dan β , bersama dengan anemia sel sabit (SCA), HbC, dan HbE (HBB: c.79 G> A), menyusun penyakit monogenik yang paling umum yang mempengaruhi konsentrasi Hb (29,30). Kondisi kelainan ini bersifat resesif Mendelian, sehingga pembawa sifat heterozigot memiliki kelainan ringan atau tidak sama sekali dan dapat meneruskan satu salinan gen untuk varian Hb kepada anaknya (29,32)

Variasi genetik yang beragam mempengaruhi konsentrasi Hb dan risiko anemia. Varian dengan efek terbesar dan frekuensi tinggi adalah gen HBA1, HBA2, dan HBB dan merupakan penyebab utama anemia di seluruh dunia. Informasi tentang distribusi geografis dan frekuensi varian genetik dengan efek paling signifikan pada konsentrasi Hb dapat dipertimbangkan untuk penyesuaian titik potong untuk menentukan jenis anemia. Variasi interindividual pada konsentrasi Hb diatur oleh polimorfisme dari gen yang terlibat dalam sintesis Hb, eritropoiesis, dan metabolisme besi. Varian tersebut dapat memberikan pengaruh pada konsentrasi Hb. Sebagian besar studi tentang efek genetik yang mendasari variasi Hb telah dilakukan pada populasi Eropa, dan studi pada populasi yang berbeda di dunia masih diperlukan (33).

PENUTUP

Terdapat lebih dari 1000 varian Hb diketahui, terutama mutasi yang mendestabilisasi Hb, mengubah afinitas Hb-O₂, atau paling umum, mengubah fungsi Hb secara minimal. Selain itu, varian yang mengubah biokimia Hb jarang mengancam jiwa atau membahayakan kesehatan. Meskipun demikian, studi tentang varian Hb sangat bermanfaat bagi sains dan kedokteran. Selain itu, pemahaman klinisi untuk mengetahui kondisi varian Hb dan hemoglobinopati sangat penting untuk mengetahui implikasinya terhadap pemeriksaan terkait konsentrasi Hb dan HbA1c. Terutama implikasi vaarain Hb dan

hemoglobinopati pada HbA1c, karena hasil harus selalu dinilai dalam konteks klinis pasien jika terdapat varian Hb yang tidak terduga. Ketika ketidakkonsistenan diamati antara pemantauan glukosa darah pasien di rumah dan konsentrasi HbA1c yang diukur di laboratorium, hasil HbA1c yang tinggi atau rendah palsu harus dipertimbangkan. Setiap hasil yang tidak berkorelasi dengan situasi klinis juga harus diselidiki. Dalam situasi ini, tes tambahan harus dilakukan menggunakan tes berdasarkan metode analitik yang berbeda, seperti pemeriksaan glycated albumin yang tidak terpengaruh oleh varian Hb atau hemoglobinopati.

DAFTAR PUSTAKA

1. Thom CS, Dickson CF, Gell DA, Weiss MJ. Hemoglobin variants: biochemical properties and clinical correlates. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2013;3(3):a011858.
2. hbVar. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>. Diakses tanggal 10 Mei 2023.
3. Ahmed MH, Ghatge MS, Safo MK. Hemoglobin: Structure, Function and Allostery. *Subcell Biochem*. 2020;94:345-82.
4. Shibayama N, Sugiyama K, Tame JR, Park SY. Capturing the hemoglobin allosteric transition in a single crystal form. *J Am Chem Soc*. 2014;136(13):5097-105.
5. Cuschieri, A. Mutation. 2022 <http://staff.um.edu.mt/acus1/5Mutations.htm>
6. Giardine B, Borg J, Viennas E, Pavlidis C, Moradkhani K, Joly P, Bartsakoulia M, Riemer C, Miller W, Tzimas G, Wajcman H, Hardison RC, Patrinos GP. Updates of the HbVar database of human hemoglobin variants and thalassemia mutations. *Nucleic Acids Res*. 2014;42:D1063-9.
7. Inusa BPD, Hsu LL, Kohli N, Patel A, Ominu-Evbota K, Anie KA, Atoyebi W. Sick Cell Disease-Genetics, Pathophysiology, Clinical Presentation and Treatment. *Int J Neonatal Screen*. 2019;7;5(2):20.
8. Galanello R, Origa R. Beta-thalassemia. *Orphanet J Rare Dis*. 2010;5:11. Published 2010 May 21.
9. Rashid A, Tabassum S, Naeem A, et al. A rare and novel mutation in a beta-globin gene of thalassemia patient of Pakistan: A case report. *Ann Med Surg (Lond)*. 2022;84:104918.
10. Kohne E. Hemoglobinopathies: clinical manifestations, diagnosis, and treatment. *Dtsch Arztebl Int*. 2011;108(31-32):532-40.
11. Tamary H, Dgany O. Alpha-Thalassemia. 2005 Nov 1 [Updated 2020 Oct 1]. In: Adam MP, Mirzaa GM, Pagon RA, et al., editors. *GeneReviews*® [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2023.

12. Forget BG, Bunn HF. Classification of the disorders of hemoglobin. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2013;3(2):a011684.
13. Globin Gene Server. HbVar: a database of human haemoglobin variants and thalassemias. 2014. Available at: <http://globin.cse.psu.edu/cgi-bin/hbvar/counter>. Accessed April 2014
14. Giardine BM, Joly P, Pissard S, Wajcman H, K Chui DH, Hardison RC, Patrinos GP. Clinically relevant updates of the HbVar database of human hemoglobin variants and thalassemia mutations. *Nucleic Acids Res*. 2021;8;49(D1):D1192-96.
15. Giardine B, Borg J, Higgs DR, et al. Systematic documentation and analysis of human genetic variation in hemoglobinopathies using the microattribution approach. *Nat Genet*. 2011;43(4):295-301.
16. Li R, Tang H, Kan L, Xiong D, Cheng X, Xu Y, Liu X, Zhang X. Evaluation on the separated effect of 13 hemoglobin variants by a new automatic Hba1c analyzer. *J Clin Lab Anal*. 2020;34(10):e23446.
17. Little RR, Roberts WL. A review of variant hemoglobins interfering with hemoglobin A1c measurement. *J Diabetes Sci Technol*. 2009;3(3):446-451.
18. Lorenzo-Medina M, De-La-Iglesia S, Ropero P, Nogueira-Salgueiro P, Santana-Benitez J. Effects of hemoglobin variants on hemoglobin a1c values measured using a high-performance liquid chromatography method. *J Diabetes Sci Technol*. 2014;8(6):1168-1176.
19. Klonoff DC. Hemoglobinopathies and Hemoglobin A1c in Diabetes Mellitus. *J Diabetes Sci Technol*. 2020;14(1):3-7.
20. Liddy AM, Grundy S, Sreenan S, Tormey W. Impact of haemoglobin variants on the use of haemoglobin A1c for the diagnosis and monitoring of diabetes: a contextualised review. *Ir J Med Sci*. 2023;192(1):169-76.
21. Impact of hemoglobin variants on Hb A1c interpretation: Do we assume too much? 1 Juni 2012. <https://www.mlo-online.com/home/article/13004446/impact-of-hemoglobin-variants-on-hb-a1c-interpretation-do-we-assume-too-much> (diakses pada 8 Mei 2023)
22. National Glycohemoglobin Standardization Program (NGSP): factors that interfere with HbA1c test results. 17 Juni 2022. <https://ngsp.org/factors.asp>. Diakses tanggal 11 Mei 2023
23. American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*. 2012;35(suppl 1):S66-S71
24. BioRad. Choose the Right HbA1c Methodology. 2023. Available at: <https://www.bio-rad.com/en-id/applications-technologies/for-healthcare-providers?ID=79360ebf-1c3b-361e-e781-328dc2351310>
25. Little RR et al. Effects of 49 Different Rare Hb Variants on HbA1c Measurement in Eight Methods. *Journal of Diabetes Science and Technology*. 2015.1-8.
26. Cavagnolli G, Pimentel AL, Freitas PA, Gross JL, Camargo JL. Factors affecting A1C in non-diabetic individuals: Review and meta-analysis. *Clin Chim Acta*. 2015;445:107-14.
27. Freitas PAC, Ehlert LR, Camargo JL. Glycated albumin: a potential biomarker in diabetes. *Arch Endocrinol Metab*. 2017;61(3):296-304.
28. Serjeant GR, Vichinsky E. Variability of homozygous sickle cell disease: The role of alpha and beta globin chain variation and other factors. *Blood Cells Mol Dis*. 2018;70:66-77.
29. Weatherall DJ. The Evolving Spectrum of the Epidemiology of Thalassemia. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2018;32(2):165-75.
30. Kohne E. Hemoglobinopathies: clinical manifestations, diagnosis, and treatment. *Dtsch Arztebl Int*. 2011;108(31-32):532-540.
31. Weatherall DJ, Williams TN, Allen SJ, O'Donnell A. The population genetics and dynamics of the thalassemias. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2010;24(6):1021-1031.
32. Weatherall DJ. Thalassemia as a global health problem: recent progress toward its control in the developing countries. *Ann N Y Acad Sci*. 2010;1202:17-23.
33. Barrera-Reyes PK, Tejero ME. Genetic variation influencing hemoglobin levels and risk for anemia across populations. *Ann N Y Acad Sci*. 2019;1450(1):32-46.

FORUM DIAGNOSTICUM

ISSN 0854-7173 | No. 3/2023

Redaksi Kehormatan

Drs. Andi Wijaya, Ph.D.
Prof. Dr. dr. FX Budhianto Suhadi

Penanggung Jawab

Dr. Trilis Yulianti, M.Kes.

Ketua Dewan Redaksi

Siska Darmayanti, S.Si., M.Farm.

Anggota Dewan Redaksi

Gianni Yosephine, S.Si., M.Farm
Matthew Justyn, S.Si.
Bena Zaira, S.Si.
Amadea Risanggita Kinanthi, S.Si
Bernadette Vania Lundina Arman S.Ked., M.A.

Alamat Redaksi

PT. Prodia Widyahusada, Tbk.
Jl. Kramat Raya 150, Jakarta 10430
Telepon: (021) 3144182 (Hunting)
Fax: (021) 3926675
e-mail: produk@prodia.co.id
website: www.prodia.co.id



Certificate Number : JKT 0403247
Certified to QMS

Mei 2023 - PR0006436