

Perfuman 8

NOW THE FUN BEGINS.

PEMERIKSAAN
ANEMIA HEMOLITIK

Defisiensi Enzim

G6PD

PEMERIKSAAN LABORATORIUM ANEMIA HEMOLITIK : G6PD

dr. Erlinda Widyastuti, Sp.PK

**DEFISIENSI ENZIM
GLUKOSA 6 PHOSPHATE DEHYDROGENASE
(G6PD)**

DEFISIENSI G6PD

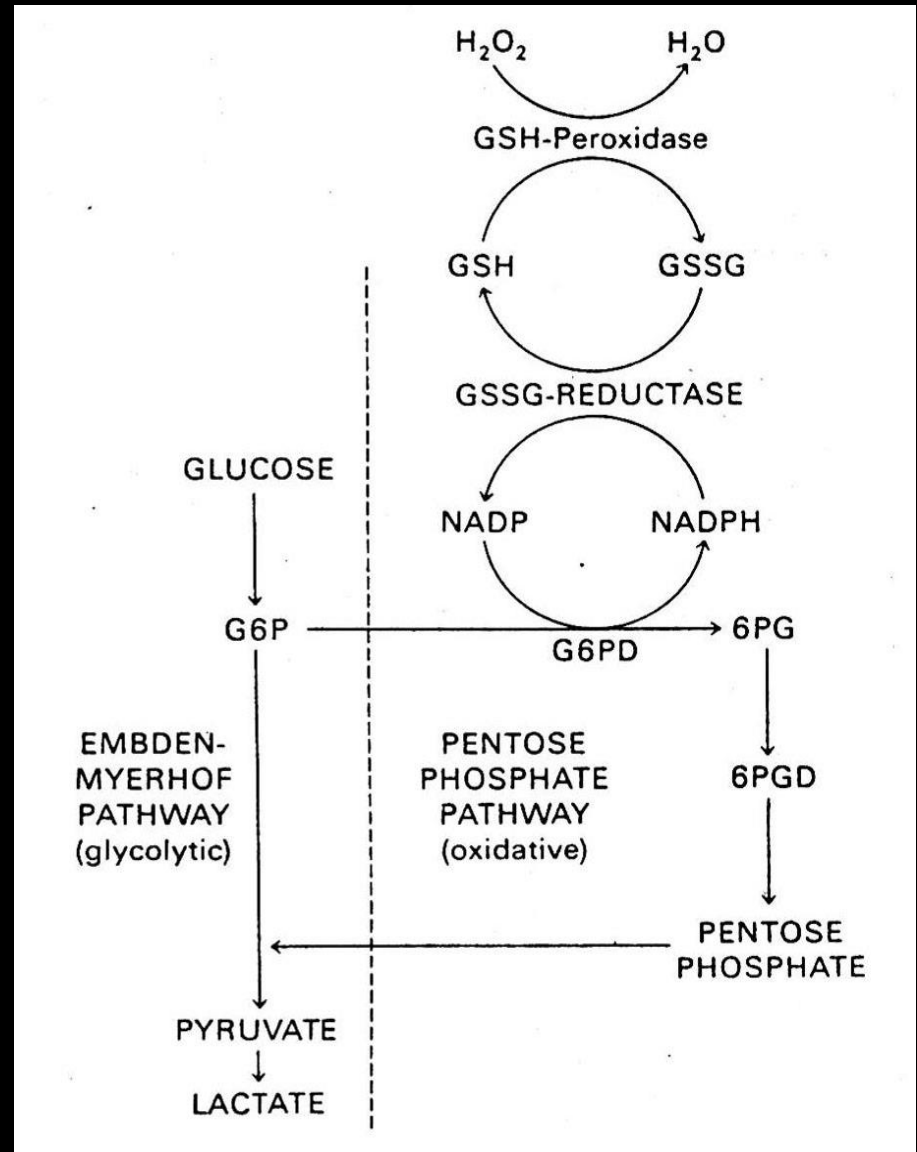
- Kelainan metabolik eritrosit yg paling banyak dijumpai
- Terjadi hemolisis bila terpapar bahan oksidan / penyakit tertentu
- Kebanyakan kasus tanpa gejala

ENZIM G6PD

- Gen G6PD terletak pada kromosom X → diturunkan secara genetik
- Penderita :
 1. Laki-laki hemizigot (X^0Y)
 2. Perempuan homozigot (X^0X^0)
 3. Perempuan heterozigot (X^0X)

PERAN ENZIM G6PD

- Berperan pd tahap awal *pentose phosphate pathway*
- G6PD mereduksi NADP → NADPH ketika mengoksidasi G6P
- NADPH diperlukan utk memproduksi *reduced glutathion* (GSH)
- GSH melindungi eritrosit terhadap oksidan



Agen Penyebab Anemia Hemolitik pd Defisiensi G6PD

6

- **Infeksi & penyakit akut lain, misal : ketoasidosis diabetik**

- **Obat**

- **Anti malaria (primakuin, klorokuin, Fansidar, maloprim)**

- **Sulfonamid & sulfon, misal kotrimoksazol, sulfanilamide, dapson, salazopirin**

- **Agen anti bakteri lain, misal nitrofurantoin, kloramfenikol.**

- **Analgesik, misal aspirin (dosis sedang aman), fenasetin.**

- **Obat cacing, misal beta-nafton, stibofen, nitrodazol.**

- **Lain-lain, misal analog vitamin K, naftalen, probenesid.**

- **Kacang fava (mungkin juga sayur lain)**

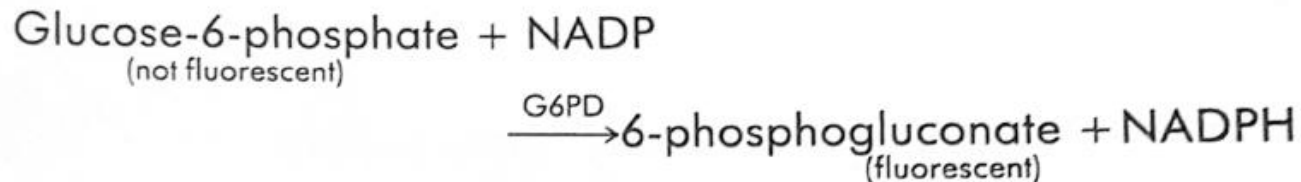
KLINIS

- Anemia hemolitik karena obat
- Anemia hemolitik karena infeksi
- Favism
- Neonatal jaundice
- *Chronic non spherocytic hemolytic anemia*

VISUAL FLUORERCENT SCREENING TEST

Prinsip :

- Enzim G6PD mengkatalisa reaksi :



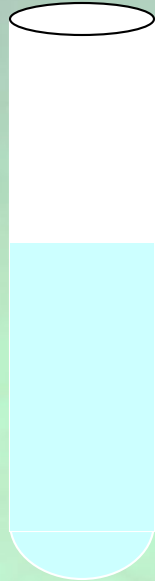
- *Mini enzyme assay*
- Fluoresensi NADPH di bawah sinar ultra violet
- Pd defisiensi G6PD, ketidakmampuan menghasilkan NADPH yg adekuat akan menyebabkan fluoresensi berkurang

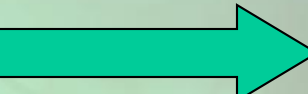
Fluorescent Spot Test

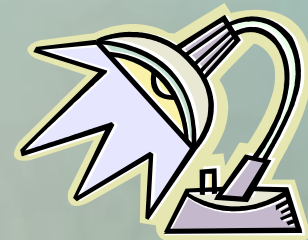
■ **0,9 ml larutan buffer-Substrat**

Buffer
Glukosa 6 phospat
Saponin
NADP
Gluthation
Aquades

■ **0,01 ml WB atau darah kering pada kertas saring 0,8 cm²**



Campur homogen

biarkan 30 menit

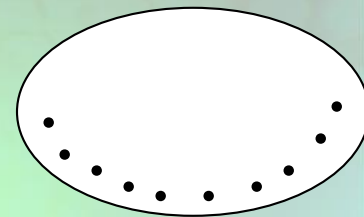


Lampu UV

Amati fluoresensi



ditotolkan



Kertas saring
Whatman No 1

Interpretasi hasil Fluorescent spot test

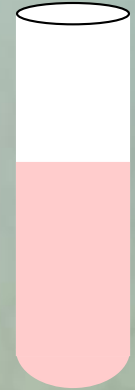
Individu normal



**Fluoresensi
terang**

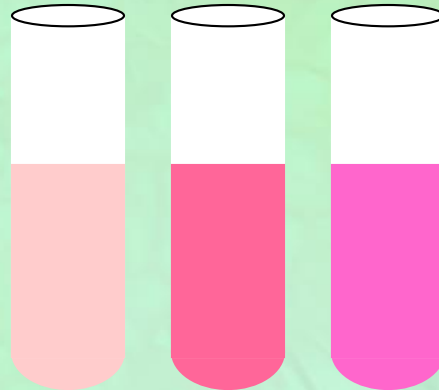
**♂ defisiensi
&**

**♀ Homozygos
defisiensi**



**Fluoresensi
lemah atau
tidak ada
fluoresensi**

**♀ Perempuan
heterozigot**



**Fluoresensi lemah,
menengah atau normal**

TES REDUKSI METHEMOGLOBIN

Prinsip :

- NaNO_2 mengubah Hb \rightarrow Hi
- Jika metilen biru tdk ditambahkan, Hi menetap
- Inkubasi sampel dg metilen biru dpt merangsang jalur pentose fosfat pd subyek dg level G6PD yg normal
- Hi direduksi pada saat periode inkubasi
- Pada subyek yg mengalami defisiensi G6PD, hambatan pada jalur pentose fosfat ini mencegah terjadinya reduksi Hi

Tes reduksi methemoglobin

1. Sampel:

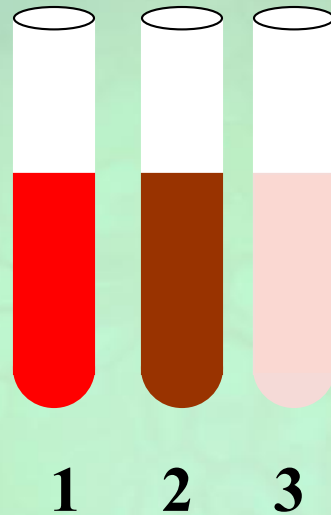
- 2 ml darah
- 0,2 ml Pereaksi
Sodium nitrit
Dextrosa
Metilen Biru
(Nile blue sulfate)
Aquadres

2. Kontrol: defisiensi G6PD:

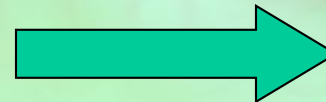
- 2 ml darah
- 0,2 ml Pereaksi
Sodium nitrit
Dextrosa
Aquadres

3. Kontrol normal:

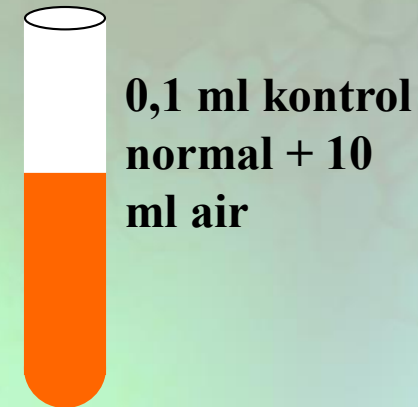
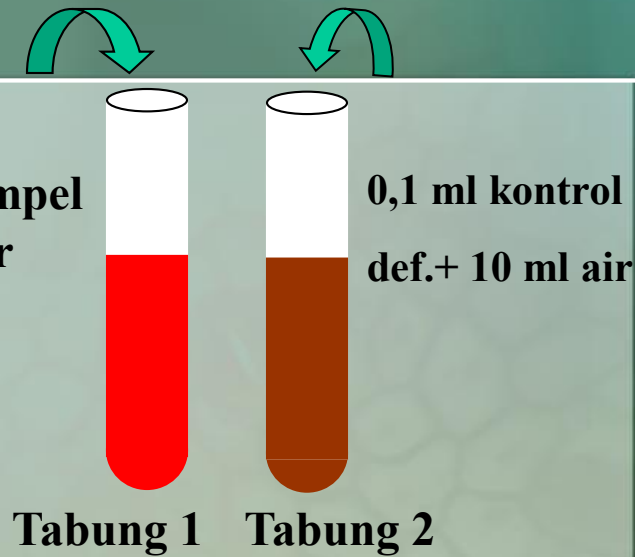
- 2 ml darah
- Tanpa pereaksi



*Campur
homogen*

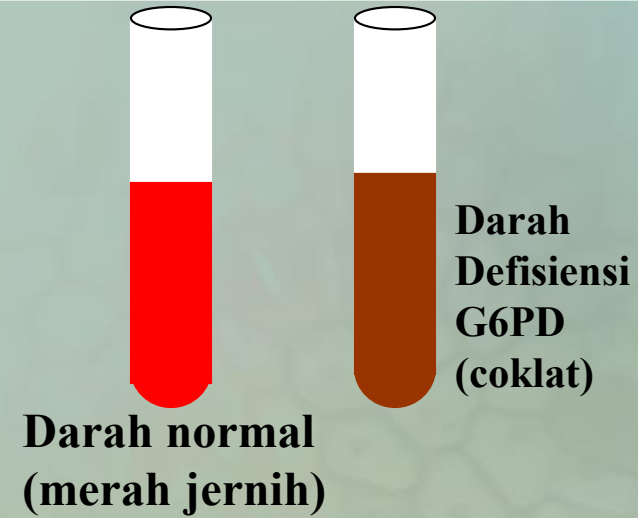


*inkubasi
3 jam*



Interpretasi tes reduksi Hi

- **Darah normal: merah jernih**
- **Darah defisiensi: coklat**
- **Heterzigot: warna antara**



PEMERIKSAAN KUANTITATIF ENZIM G6PD

- Utk mengetahui tingkatan aktivitas enzim G6PD
- Prinsip : mengukur kecepatan produksi NADPH secara fotometris ($\lambda = 340 \text{ nm}$)
- Sampel : hemolizat
- Metode :
 - Pemeriksaan dilakukan pd suhu 30°C
 - Reagen & aquades di inkubasi 10 mnt sebelum menambahkan substrat
 - Perubahan absorban setelah penambahan substrat diukur setelah 5 menit reaksi

PEMERIKSAAN KUANTITATIF ENZIM G6PD

Pengumpulan sampel

*Darah + anti koagulan
(heparin, EDTA, ACD)*



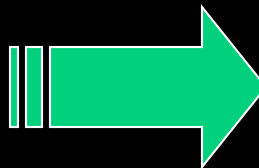
Pencucian sampel

Sentrifus/filtrasi



Preparasi hemolisat

*+ lar. Pelisis,
pembekuan - pencairan*



**Kalkulasi Aktivitas
Enzim**

$$= \Delta A / \text{min} \times \frac{10^3}{6,22}$$



**Fotometris
UV, λ 340 nm**



+ G6P

Tris-HCl EDTA

MgCl₂

NADP

hemolisat

Aquades

*Inkubasi
10'*

AKTIVITAS ENZIM G6PD

- Hasil dapat dilaporkan dalam :
 - a. Per ml eritrosit
 - b. Per 10^{10} eritrosit
 - c. Per gram Hb

- Nilai normal orang dewasa :

8,83 ± 1,59 eu/g Hb pada suhu 30°C

terimakasih



Terima Kasih



HAVE FUN!