

AKTIVITI DAN PENCIRIAN BIOKIMIA ENZIM GLUKOSA-6-FOSFAT  
DEHIDROGENASE (G6PD) DI KALANGAN  
KAUM MELAYU DAN CINA  
DI MALAYSIA

ZAINAL ARIF PERWIRA BIN ZAINAL ABIDIN

TESIS YANG DIKEMUKAKAN UNTUK MEMPEROLEH IJAZAH  
SARJANA SAINS PERUBATAN

FAKULTI PERUBATAN  
UNIVERSITI KEBANGSAAN MALAYSIA  
KUALA LUMPUR

P2



00001111225

## PENGAKUAN

Saya akui karya ini adalah hasil kerja saya sendiri kecuali nukilan dan ringkasan yang tiap-tiap satunya telah saya jelaskan sumbernya.

21 Mac 1998

  
ZAINAL ARIF PERWIRA BIN ZAINAL ABIDIN  
A 4872



## PENGHARGAAN

Saya ingin merakamkan ribuan terima kasih saya kepada mereka yang telah membantu di dalam proses penyelidikan serta penyediaan tesis ini:

- \* Prof. Madya Dr. Ainoon Othman daripada Jabatan Patologi dan Prof. Dr. Ton So Har daripada Jabatan Biokimia, Fakulti Perubatan, Universiti Kebangsaan Malaysia, selaku penyelia saya. Saya mengucapkan ribuan terima kasih di atas segala dorongan, pertolongan, bimbingan serta penyeliaan semasa menjalankan penyelidikan dan penulisan tesis ini.
- \* Prof. Dr. Boo Nem Yun daripada Jabatan Pediatrik, Fakulti Perubatan, Universiti Kebangsaan Malaysia dan Dr. Yasmin Ayub daripada Pusat Tabung Darah, Hospital Besar, Kuala Lumpur, yang banyak memberikan kerjasama dan bantuan dalam pengumpulan sampel.
- \* Puan Joyce Anne Jabamoney daripada Makmal DNA, Jabatan Patologi di atas segala pertolongan serta tunjuk ajar dan sokongan moral semasa penyelidikan dijalankan.
- \* Terima kasih kepada Ketua Jabatan dan semua kakitangan Jabatan Patologi dan Jabatan Biokimia, Fakulti Perubatan, Universiti Kebangsaan Malaysia di atas kebenaran serta kerjasama yang telah diberikan.
- \* Ribuan terima kasih kepada semua pihak yang secara langsung atau tidak langsung memberikan sokongan dan dorongan.

## ABSTRAK

Tujuan kajian ini dijalankan adalah untuk memperkembangkan kaedah ujian esei kuantitatif bagi diagnosis kekurangan aktiviti G6PD dan kaedah pencirian biokimia bagi menentukan varian G6PD di kalangan kaum Melayu dan Cina di Malaysia. Seramai 188 sampel neonat, 140 sampel bayi, 114 sampel kanak-kanak dan 168 sampel dewasa yang normal digunakan untuk menentukan julat normal aktiviti G6PD. Julat normal aktiviti G6PD pada kedua-dua kumpulan etnik tersebut ditentukan mengikut kaum, umur dan jantina. Dua kategori umur yang menunjukkan perbezaan pada julat normal aktiviti enzim dikenalpasti; kategori sampel yang berumur kurang daripada setahun dan kategori yang berusia lebih daripada setahun. Seramai 276 sampel dirujuk sebagai pesakit kekurangan G6PD telah dikaji. Seramai 50 orang daripada mereka (18.2%) menunjukkan aktiviti yang normal. Suatu perbandingan terhadap kesensitifan untuk mengesan kes kekurangan G6PD antara ujian titik pendarfluor dengan ujian esei aktiviti telah ditentukan. Kaedah ujian esei aktiviti G6PD didapati lebih sensitif dalam menentukan kekurangan G6PD. Ini terutamanya penting dalam mengenalpasti perempuan heterozigot. Melalui kaedah pencirian biokimia yang berdasarkan kepada ujian esei aktiviti G6PD, mobiliti protein secara elektroforesis dan substrat analog (2dG6P dan dNADP) varian G6PD pada kaum Melayu dan kaum Cina dikenalpasti. Seramai 219 sampel lelaki yang kekurangan G6PD digunakan untuk menentukan varian G6PD. Sebanyak 15 jenis varian telah ditemui pada kaum Melayu dan kaum Cina di Malaysia, di mana 10 daripadanya terdapat pada kedua-dua kaum ini. Seramai 12 orang (7 Melayu dan 5 Cina) mempunyai varian yang belum pernah dilaporkan. Diantara varian-varian G6PD yang ditemui ialah Taipei-Hakka, Canton, N-Sawan, Kaiping, Anant, Mahidol, Chinese, Gifu-Like, dan Gaohe atau Hong Kong Pokfulam. Varian Birmingham dan Songkhla hanya didapati pada kaum Melayu, sementara varian Huazhou, Taiwan-Hakka dan Nanhai hanya ditemui pada kaum Cina. Tiada hubungan didapati antara tahap keterukan jaundis neonatal dengan tahap keterukan kekurangan G6PD.

**ENZYME ACTIVITY AND BIOCHEMICAL CHARACTERIZATION OF  
GLUCOSE-6-PHOSPHATE DEHYDROGENASE (G6PD) IN  
MALAYS AND CHINESE  
IN MALAYSIA**

**ABSTRACT**

The purpose of this study is to expand a quantitative method for measuring G6PD activity for the diagnosis of G6PD deficient individuals and biochemical methods for characterization of G6PD variants of Malays and Chinese in Malaysia. Normal samples from 188 neonates, 140 babies, 114 children and 168 adults were used to obtain normal reference ranges. The normal ranges for the two ethnic groups were based on race, age and sex. Two categories based on age were obtained, namely less than a year old for babies and more than a year old for adults. Two hundred and seventy six samples, referred as G6PD-deficients, were studied. Fifty of them (18.2%) were found to have normal activities. The sensitivity in detecting G6PD deficiency by the fluorescent spot test and an enzyme assay was compared. The enzyme assay test was found to be more sensitive. The test is particularly useful in detecting female heterozygotes. G6PD variants in Malays and Chinese were characterized by using biochemical tests which included an assay involving enzyme activity, electrophoretic mobility of the protein and an assay using substrate analogues (2dG6P and dNADP). Two hundred and nineteen samples from G6PD deficient males were studied. Fifteen variants were found in Malays and the Chinese, 10 of which could be found in both ethnic groups. Twelve samples (7 Malays and 5 Chinese) had variants which were not reported before. Among the variants found were Taipei-Hakka, Canton, N-Sawan, Kaiping, Anant, Mahidol, Chinese, Gifu-Like, and Gaohe or Hong Kong Pokfulam. Variant Birmingham and variant Songkhla could only be detected in Malays while variants Huazhou, Taiwan-Hakka and Nanhai could only be detected in the Chinese. It was found that there was no relation between the seriousness of jaundice and the severity of G6PD deficiency.

## KANDUNGAN

|                                                         | Halaman |
|---------------------------------------------------------|---------|
| <b>PENGAKUAN</b>                                        | ii      |
| <b>PENGHARGAAN</b>                                      | iii     |
| <b>ABSTRAK</b>                                          | iv      |
| <b>ABSTRACT</b>                                         | v       |
| <b>KANDUNGAN</b>                                        | vi      |
| <b>SENARAI JADUAL</b>                                   | xii     |
| <b>SENARAI RAJAH</b>                                    | xiv     |
| <b>SENARAI FOTOGRAF</b>                                 | xv      |
| <b>SENARAI SINGKATAN / TATANAMA</b>                     | xvi     |
| <b>BAB I TINJAUAN KEPUSTAKAAN</b>                       |         |
| 1.1 Sejarah Penemuan G6PD                               |         |
| 1.2 Glukosa-6-Fosfat Dehidrogenase (G6PD)               | 2       |
| 1.3 Keadaan Kekurangan G6PD                             | 8       |
| 1.3.1 Varian G6PD                                       | 11      |
| 1.4 Perspektif Klinikal                                 | 15      |
| 1.4.1 Jaundis Neonatal                                  | 16      |
| 1.4.2 Favisme                                           | 18      |
| 1.4.3 Anemia Hemolitik Akut                             | 19      |
| 1.4.4 Anemia Hemolitik Tak Sferositik Keturunan (HNSHA) | 20      |

|       |                                       |    |
|-------|---------------------------------------|----|
| 1.4.5 | Pengaruh Faktor-Faktor Lain           | 21 |
| 1.5   | Penemuan Hematologi                   | 22 |
| 1.6   | Penemuan Genetik                      | 23 |
| 1.6.1 | Pertalian X                           | 24 |
| 1.6.2 | Heterozigot                           | 25 |
| 1.7   | Diagnosis dan Rawatan Kekurangan G6PD | 26 |
| 1.8   | G6PD di Malaysia                      | 28 |
| 1.9   | Objektif Penyelidikan                 | 31 |

## **BAB II BAHAN DAN KAEDAH**

|         |                                                   |    |
|---------|---------------------------------------------------|----|
| 2.1     | Bahan                                             | 32 |
| 2.1.1   | Populasi Kajian                                   | 32 |
| 2.1.1.1 | Sampel Normal                                     | 32 |
| 2.1.1.2 | Pesakit yang Kekurangan G6PD                      | 33 |
| 2.1.2   | Pensampelan Darah                                 | 35 |
| 2.2     | Prosedur Rutin                                    | 35 |
| 2.2.1   | Penyediaan Bahan-Bahan dan Larutan                | 35 |
| 2.3     | Kaedah                                            | 35 |
| 2.3.1   | Pemeriksaan Gambaran Darah Lengkap ( <i>FBP</i> ) | 35 |
| 2.3.2   | Ujian Penyaringan Titik Pendarfluor               | 36 |
| 2.3.3   | Pengiraan Retikulosit                             | 37 |
| 2.3.4   | Penyediaan Hemolisat                              | 37 |
|         | Esei G6PD                                         | 38 |

|               |                                                                                                                              |    |
|---------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 2.3.5.1       | Esei G6PD dengan Analog Substrat<br>2-deoksi-Glukosa-6-Fosfat (2dG6P) dan<br>deamino-NADP <sup>+</sup> (dNADP <sup>+</sup> ) | 39 |
| 2.3.5.2       | Kepekatan Hemoglobin cara Sianmethemoglobin<br>(Dacie 1984)                                                                  | 39 |
| 2.3.6         | Elektroforesis G6PD                                                                                                          | 40 |
| 2.3.6.1       | Pewarnaan                                                                                                                    | 41 |
| 2.3.7         | Proses Separa Penulinan G6PD                                                                                                 | 42 |
| 2.3.7.1       | Limfoprep                                                                                                                    | 42 |
| 2.3.7.1.1     | Leukosit                                                                                                                     | 42 |
| 2.3.7.1.2     | Eritrosit                                                                                                                    | 43 |
| 2.3.7.1.2.1   | Penyediaan Hemolizat                                                                                                         | 43 |
| 2.3.7.1.2.2   | Eliminasi Hemoglobin                                                                                                         | 44 |
| 2.3.7.1.2.3   | Pemendakan dengan<br>Ammonia Sulfat                                                                                          | 45 |
| 2.3.7.1.2.4   | Pengasingan Ammonia<br>Sulfat                                                                                                | 45 |
| 2.3.7.1.2.4.1 | Ketetapan<br>Pemalar<br>Michaelis<br>G6P (Km)                                                                                | 46 |
| 2.3.7.1.2.4.2 | Graf<br>Optimum pH                                                                                                           | 47 |
| 2.3.7.1.2.4.3 | Kestabilan<br>Enzim pada<br>Hawa Panas                                                                                       | 47 |
| 2.4           | Analisis Statistik                                                                                                           | 49 |
| 2.4.1         | Min Aritmetik ( $\bar{x}$ )                                                                                                  | 49 |
| 2.4.2         | Sisihan Piawai ( $s$ )                                                                                                       | 49 |



|       |                         |    |
|-------|-------------------------|----|
| 2.4.3 | Pekali Variasi (P.V.)   | 50 |
| 2.4.4 | Hipotesis Nol ( $H_0$ ) | 50 |

### **BAB III HASIL KAJIAN**

|       |                                                                                                                    |    |
|-------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 3.1   | Penilaian dan Pengoptimuman Kaedah-Kaedah yang Digunakan Untuk Diagnosis Kekurangan G6PD                           | 51 |
| 3.1.1 | Ujian Penyaringan Titik Pendarfluor                                                                                | 51 |
| 3.1.2 | Ujian Esei Aktiviti G6PD                                                                                           | 52 |
| 3.2   | Kaedah Pencirian Biokimia G6PD ke atas Hemolizat                                                                   | 56 |
| 3.2.1 | Elektroforesis G6PD                                                                                                | 56 |
| 3.2.2 | Ujian Analog Substrat 2-deoksi-G6P (2dG6P)                                                                         | 59 |
| 3.2.3 | Ujian Analog Substrat Deamino-NADP <sup>+</sup> (dNADP <sup>+</sup> )                                              | 61 |
| 3.3   | Penentuan Julat Normal Aktiviti G6PD                                                                               | 63 |
| 3.3.1 | Populasi Normal                                                                                                    | 63 |
| 3.3.2 | Keputusan Pencirian Biokimia bagi Populasi Normal                                                                  | 74 |
| 3.4   | Perbandingan Keputusan Ujian Penyaringan Titik Pendarfluor di HKL dan di Makmal Penyelidikan UKM                   | 79 |
| 3.4.1 | Perbandingan Diantara Keputusan Ujian Titik Pendarfluor dengan Ujian Esei Aktiviti G6PD                            | 81 |
| 3.4.2 | Perbandingan Diantara Keputusan Ujian Titik Pendarfluor Dengan Ujian Esei Aktiviti G6PD bagi Perempuan Heterozigot | 83 |
| 3.5   | Penentuan Varian Enzim G6PD                                                                                        | 85 |
| 3.5.1 | Mobiliti secara Elektroforesis                                                                                     | 85 |

|         |                                                                                          |     |
|---------|------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 3.5.1.1 | Varian Mobiliti Elektroforesis Perlahan berdasarkan Mobiliti Enzim secara Elektroforesis | 91  |
| 3.5.1.2 | Varian G6PD yang Menunjukkan Mobiliti Normal secara Elektroforesis                       | 92  |
| 3.5.13  | Varian G6PD yang Menunjukkan Mobiliti Laju secara Elektroforesis                         | 101 |
| 3.6     | Hubungan Klinikal Dengan Tahap Kekurangan Aktiviti G6PD                                  | 105 |

#### **BAB IV PERBINCANGAN**

|         |                                                                                                                                                   |     |
|---------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 4.1     | Penilaian dan Pengoptimuman Kaedah Pengesanan Keadaan Kekurangan G6PD                                                                             | 107 |
| 4.1.1   | Kaedah Ujian Titik Pendarfluor                                                                                                                    | 107 |
| 4.1.2   | Kaedah Esei Aktiviti G6PD                                                                                                                         | 109 |
| 4.2     | Penentuan Julat Normal Aktiviti Enzim G6PD                                                                                                        | 109 |
| 4.3     | Diagnosis Keadaan Kekurangan G6PD - Perbandingan Ujian Penyaringan di Hospital Besar Kuala Lumpur Dengan Ujian Penyaringan di Makmal Penyelidikan | 112 |
| 4.4     | Diagnosis Kekurangan G6PD - Perbandingan Ujian Penyaringan Titik Pendarfluor Dengan Ujian Esei Aktiviti G6PD                                      | 114 |
| 4.5     | Kaedah Pengesanan Varian G6PD                                                                                                                     | 116 |
| 4.5.1   | Pencirian Biokimia                                                                                                                                | 116 |
| 4.5.2   | Penemuan Varian G6PD                                                                                                                              | 118 |
| 4.5.2.1 | Mobiliti Secara Elektroforesis                                                                                                                    | 119 |
| 4.6     | Hubungan Jaundis Neonatal dengan Tahap Kekurangan Aktiviti G6PD                                                                                   | 123 |
| 4.7     | Hubungan Varian Dengan Sejarah dan Antropologi                                                                                                    | 124 |

|     |                 |     |
|-----|-----------------|-----|
| 4.8 | Kajian Lanjutan | 125 |
|-----|-----------------|-----|

## **BAB V KESIMPULAN**

|     |         |     |
|-----|---------|-----|
| 5.1 | Rumusan | 127 |
|-----|---------|-----|

|                |            |
|----------------|------------|
| <b>RUJUKAN</b> | <b>132</b> |
|----------------|------------|

## **LAMPIRAN**

|   |                                                                         |     |
|---|-------------------------------------------------------------------------|-----|
| A | Ubat-ubatan yang perlu dielakkan oleh pesakit yang Kekurangan G6PD      | 138 |
| B | Penyediaan bahan-bahan dan larutan yang digunakan                       | 139 |
| C | Formula paras aktiviti G6PD (IU/g Hb)                                   | 141 |
| D | Graf piawaian hemoglobin                                                | 142 |
| E | Interaksi molekul G6PD dengan sephadex A-50                             | 143 |
| F | Perbandingan ujian penyaringan titik pendarfluor dengan ujian esei G6PD | 145 |
| G | Diantara varian-varian G6PD yang pernah dilaporkan (Beutler 1990)       | 153 |
| H | Data kajian                                                             | 155 |

## SENARAI JADUAL

| No. Jadual |                                                                                                                   | Halaman |
|------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------|
| 1.1        | Insiden Kekurangan G6PD yang Pernah Dilaporkan di Malaysia.                                                       | 30      |
| 3.1        | Keputusan Aktiviti G6PD bagi Ujian Kestabilan Sampel pada Suhu yang Berlainan.                                    | 53      |
| 3.2        | Aktiviti G6PD (IU/g Hb) bagi satu Sampel Normal dalam Ujian Pembolehlungan.                                       | 55      |
| 3.3        | Keputusan Ujian Pembolehlungan untu satu Sampel Normal bagi Ujian Analog Substrat 2dG6P (%G6P).                   | 60      |
| 3.4        | Keputusan Ujian Pembolehlungan Sampel Normal bagi Ujian Analog Substrat dNADP <sup>+</sup> (%NADP <sup>+</sup> ). | 62      |
| 3.5        | Taburan Umur Menurut Kaum dan Jantina bagi Sampel Normal.                                                         | 64      |
| 3.6        | Keputusan Ujian Esei Aktiviti G6PD bagi Sampel Neonat Menurut Kaum dan Jantina.                                   | 66      |
| 3.7        | Keputusan Ujian Esei Aktiviti G6PD bagi Sampel Bayi Menurut Kaum dan Jantina.                                     | 67      |
| 3.8        | Keputusan Ujian Esei Aktiviti G6PD bagi Sampel Kanak-kanak Menurut Kaum dan Jantina.                              | 68      |
| 3.9        | Keputusan Ujian Esei Aktiviti G6PD bagi Sampel Dewasa Menurut Kaum dan Jantina.                                   | 69      |
| 3.10       | Aktiviti G6PD bagi Sampel Berumur Kurang Daripada Setahun Menurut Kaum dan Jantina.                               | 72      |
| 3.11       | Aktiviti G6PD bagi Sampel Berumur Lebih Daripada Setahun Menurut Kaum dan Jantina.                                | 73      |
| 3.12       | Keputusan Ujian Pencirian Biokimia bagi Sampel Normal.                                                            | 75      |
| 3.13       | Taburan Keputusan Ujian Titik Pendarfluor bagi Sampel yang Dirujuk Sebagai Pesakit G6PD Menurut Jantina.          | 80      |

|      |                                                                                                                         |     |
|------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 3.14 | Ujian Esei Aktiviti G6PD (% normal) Menurut Kaum dan Jantina. ( $n=276$ )                                               | 82  |
| 3.15 | Perbandingan Ujian Titik Pendarfluor dengan Ujian Esei Aktiviti G6PD bagi Perempuan Heterozigot.                        | 84  |
| 3.16 | Ujian Mobiliti secara Elektroforesis pada Kes Lelaki Kekurangan G6PD bagi Kaum Melayu dan Cina.                         | 90  |
| 3.17 | Aktiviti G6PD Bagi Pesakit Lelaki Yang Mempunyai Mobiliti Enzim 100% secara Elektroforesis.                             | 93  |
| 3.18 | Perbandingan Pencirian Biokimia Diantara Varian Tempatan dengan Varian Anant (Thai).                                    | 94  |
| 3.19 | Perbandingan Pencirian Biokimia Diantara Varian Tempatan dengan Varian Mahidol.                                         | 95  |
| 3.20 | Ujian bagi Sampel-Sampel yang Tidak Dapat Ditentukan Varian.                                                            | 96  |
| 3.21 | Varian pada Kaum Cina yang Menunjukkan 100% Mobiliti.                                                                   | 98  |
| 3.22 | Varian G6PD pada Kaum Melayu.                                                                                           | 100 |
| 3.23 | Varian G6PD yang Menunjukkan Mobiliti secara Elektroforesis Cepat pada Kaum Melayu.                                     | 102 |
| 3.24 | Varian G6PD yang Menunjukkan Mobiliti secara Elektroforesis Cepat pada Kaum Cina.                                       | 104 |
| 3.25 | Perbandingan Ujian Serum Bilirubin dengan Aktiviti G6PD bagi Sampel Neonat Lelaki yang Menunjukkan Jaundis ( $n=154$ ). | 106 |

**SENARAI RAJAH**

| No. Rajah |                                                                                                                                                  | Halaman |
|-----------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------|
| 1.1       | Peranan G6PD dalam Metabolisme Eritrosit.<br>Rajah disalin daripada WHO, 1985, hlm. 15.                                                          | 4       |
| 1.2       | NADPH Dihasilkan Untuk Melindungi Eritrosit<br>Daripada Pemusnahan oleh Superoksida dan Peroksida.<br>Rajah disalin daripada WHO, 1985, hlm. 16. |         |
| 1.3       | Mekanisme Hemolisis pada Sel Kekurangan G6PD.<br>Rajah disalin daripada Dacie, 1985, hlm. 173.                                                   | 7       |
| 1.4       | Taburan Geografi Insidens Kekurangan G6PD di Seluruh<br>Dunia.                                                                                   | 10      |
| 2.1       | Taburan Sampel Kekurangan G6PD Menurut Kaum<br>dan Jantina.                                                                                      | 34      |
| 3.1       | pH Optimum bagi Sampel Normal.                                                                                                                   | 77      |
| 3.2       | Kestabilan Enzim G6PD bagi Sampel Normal.                                                                                                        | 78      |

## SENARAI FOTOGRAF

| No. Fotograf |                                                                                                                                   | Halaman |
|--------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------|
| 3.1          | Gambarfoto Elektroforesis bagi Sampel-Sampel Normal (100% normal).                                                                | 57      |
| 3.2          | Gambarfoto Elektroforesis bagi Ujian Pembolehulangan.                                                                             | 58      |
| 3.3          | Gambarfoto Elektroforesis bagi Sampel-Sampel Kekurangan G6PD yang Menunjukkan Mobiliti Enzim yang Berbeza.                        | 86      |
| 3.4          | Gambarfoto Elektroforesis bagi Sampel-Sampel Kekurangan G6PD yang mana Salah Seorang Daripadanya Mempunyai Dua Jalur G6PD.        | 87      |
| 3.5          | Gambarfoto Elektroforesis bagi Sampel- Sampel Kekurangan G6PD yang mana Salah Satu Daripadanya Menunjukkan Tiga Jalur Hemoglobin. | 88      |



# SENARAI SINGKATAN / TATANAMA

|                    |                                          |
|--------------------|------------------------------------------|
| DEAE               | Dietilaminoetil                          |
| 2dG6P              | 2-deoksi-glukosa-6-fosfat                |
| dNADP <sup>+</sup> | Deamino nikotinamid adenine dinukleotida |
| EACA               | Asid ε-amino-n-kaproik                   |
| EDTA               | Etilenadiamina asid tetraasetik          |
| FBP                | Gambaran darah lengkap                   |
| G6P                | D-glukosa-6-fosfat                       |
| G6PD               | Glukosa-6-fosfat dehidrogenase           |
| GSSG               | Glutation oksida                         |
| GSHPx              | Glutation peroksidase                    |
| GSH                | Glutation terturun                       |
| HCl                | Asid hidroklorid                         |
| HNSHA              | Anemia hemolitik tidak sferositik        |
| HB                 | Hemoglobin                               |



|               |                                                            |
|---------------|------------------------------------------------------------|
| KCl           | Kalium klorida                                             |
| KCN           | Kalium sainid                                              |
| $K_3Fe(CN)_6$ | Kalium feri sainid                                         |
| $KH_2PO_4$    | Kalium dihidrogen fosfat                                   |
| Km            | Pemalar Michaelis                                          |
| $MgCl_2$      | Magnesium klorida                                          |
| MTT           | 3-[4,5-Dimetilthiazol-2-yl]-2,5-dipeniltetrazolium bromida |
| $NADP^+$      | $\beta$ -Nikotinamid adenine dinukliotid                   |
| $NaHCO_3$     | Natrium bikarbonat                                         |
| PBS           | Larutan penampan salina fosfat                             |
| PMS           | Fenazine metosulfat                                        |
| p.s.m         | Pusingan seminit                                           |
| RBC           | Sel darah merah (eritrosit)                                |
| S.M.          | Sebelum masihi                                             |
| TBE           | Tris-borik-EDTA                                            |
| WBC           | Sel darah putih (leukosit)                                 |

## **BAB I**

### **TINJAUAN KEPUSTAKAAN**

#### **1.1 Sejarah Penemuan Glukosa-6-Fosfat Dehidrogenase (G6PD)**

Pada tahun 1926 Cordes melaporkan kejadian hemolisis akut pada empat daripada 72 orang Negro-Amerika selepas mereka mengambil ubat antimalaria, 8-aminoquinoline (Lytt 1961). Seterusnya, dalam tahun 1948, Earle dan rakan-rakan telah melaporkan bahawa ubat tersebut boleh menyebabkan hemolisis pada hampir 5 - 10 peratus orang Negro-Amerika tetapi jarang berlaku di kalangan bangsa Eropah (Gruchy 1975). Penemuan yang sama terhadap ubat primaquine telah ditemui oleh Hockwald dan rakan-rakan pada tahun 1952 apabila 5 daripada 110 orang Negro-Amerika mengalami anemia yang serius setelah mengambil ubat tersebut (Gruchy 1975). Pada tahun 1954, Dern menemui beberapa jenis ubat lain yang boleh menyebabkan hemolisis (Gruchy 1975). Dalam tahun 1955, Beutler dan rakan-rakan membuat suatu penemuan yang penting apabila mereka mendapati bahawa sel darah merah yang sensitif terhadap ubat tertentu menunjukkan keabnormalan biokimia di mana kandungan glutathione terturun dalam sel ini adalah rendah (Gruchy 1975). Pada tahun 1956, Carson menunjukkan bahawa asas keabnormalan tersebut adalah disebabkan oleh kekurangan glukosa-6-fosfat dehidrogenase (G6PD; E.C. 1.1.1.49) (Gruchy 1975).

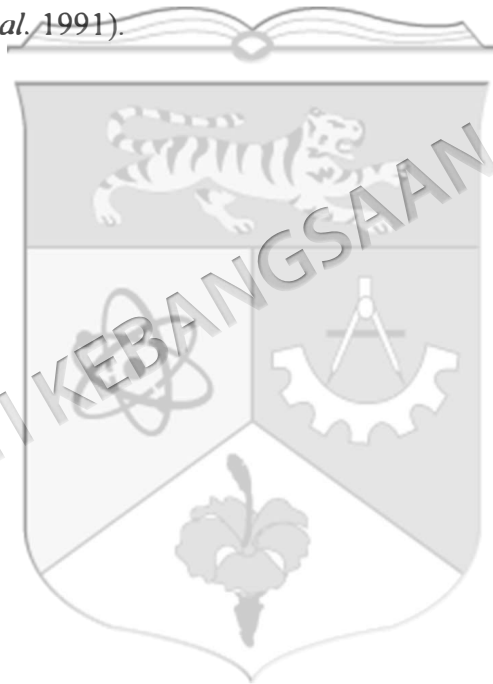
Penemuan tentang anemia hemolisis cetusan-primaquine berkaitan dengan kekurangan G6PD dalam sel darah merah telah membawa kepada banyak penyelidikan yang penting terhadap perubatan klinikal, genetik dan antropologi (WHO 1967). Banyak lagi anemia hemolisis cetusan-ubat dan berbagai penyakit hemolisis seperti favisme, anemia akibat infeksi, beberapa penyakit hemolisis pada bayi yang sukar dikenali, dan anemia hemolisis tidak sferositik kronik (HNSHA) adalah berpunca daripada kekurangan G6PD (Beutler *et al.* 1968; Motulsky *et al.* 1969).

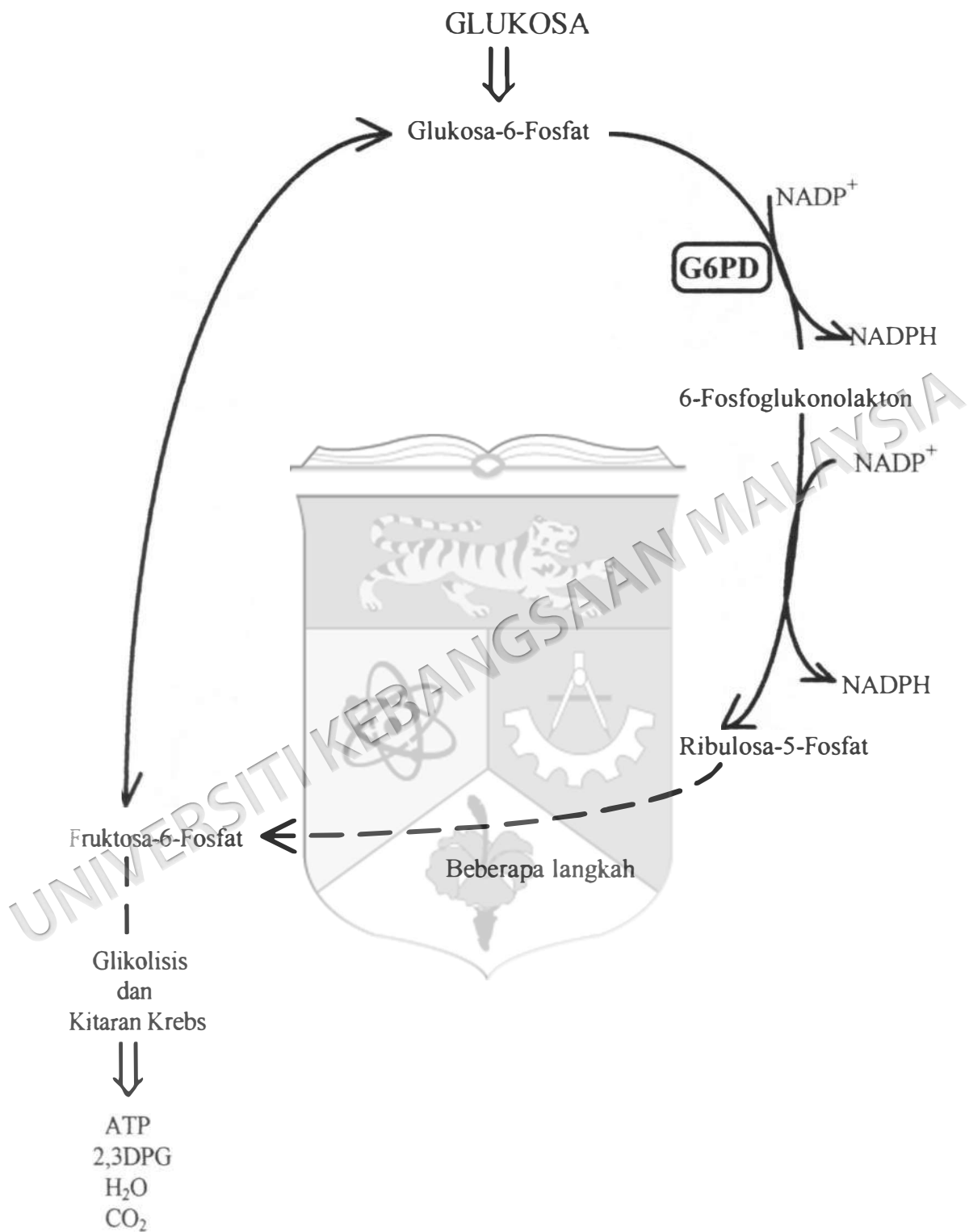
## 1.2 Glukosa-6-Fosfat Dehidrogenase (G6PD)

G6PD tulen daripada sel darah merah manusia mempunyai berat molekul sebanyak 240,000 dalton. Ia terdiri daripada enam subunit yang serupa. Setiap unit mempunyai berat molekul 40,000 dalton. Dalam keadaan monomer, G6PD terdiri daripada 515 asid amino. Bagi enzim yang aktif, ianya adalah dalam bentuk dimer dan mempunyai NADP<sup>+</sup> yang terikat kuat (Beutler 1994).

G6PD adalah salah satu enzim yang berperanan dalam laluan hexosa monofosfat yang terlibat dalam metabolisme glukosa di mana NADP<sup>+</sup> diturunkan kepada NADPH (Rajah 1.1). Pada keadaan fisiologi yang normal, glikolisis dalam sel darah merah adalah anaerobik dan menghasilkan laktat (Laluan "*Embden Meyerhof*"). Semasa glikolisis satu molekul NAD<sup>+</sup> diturunkan kepada NADH sementara satu molekul NADH dioksidakan kepada NAD<sup>+</sup> pada penghasilan laktat

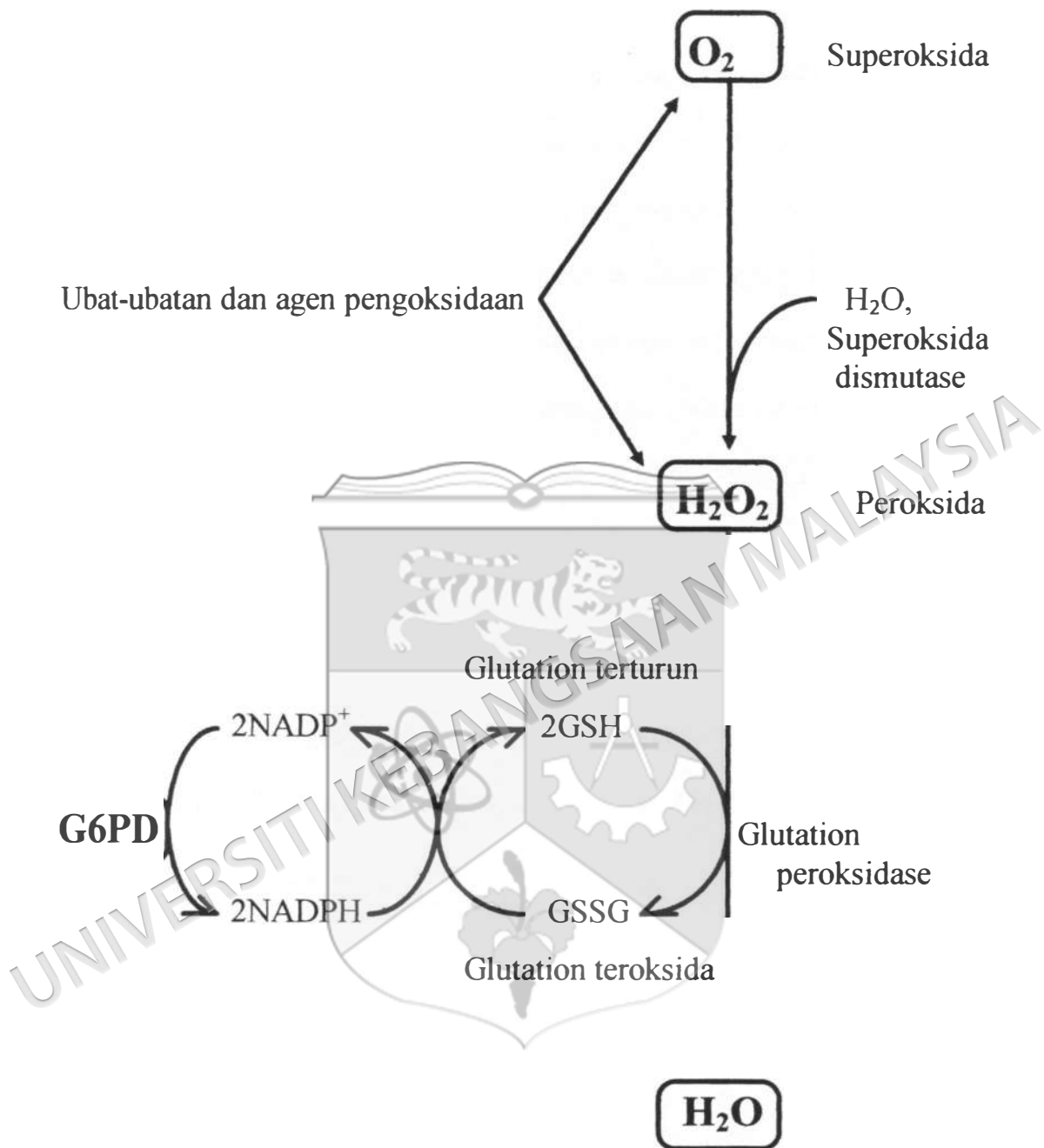
iaitu tiada “*net*” NADH dihasilkan (tindakbalas stoikiometri). Oleh kerana sel darah merah manusia yang matang tidak mengandungi enzim kitaran Krebs (Kitaran asid sitrik), laluan hexosa monofosfat dalam sel merah adalah penting untuk menghasilkan NADPH. NADPH ini penting untuk mempertahankan glutathione dalam keadaan terturun. Glutathione terturun penting untuk melindungi sebatian sulfidril di permukaan dan di dalam membran sel darah merah daripada kesan peroksida. Glutathione terturun juga diperlukan untuk katabolisme hidrogen peroksida yang dihasilkan di dalam sel darah merah (Rajah 1.2) (Gruchy 1975; WHO 1989; Scott *et al.* 1991).





RAJAH 1.1 Peranan G6PD dalam Metabolisme Eritrosit

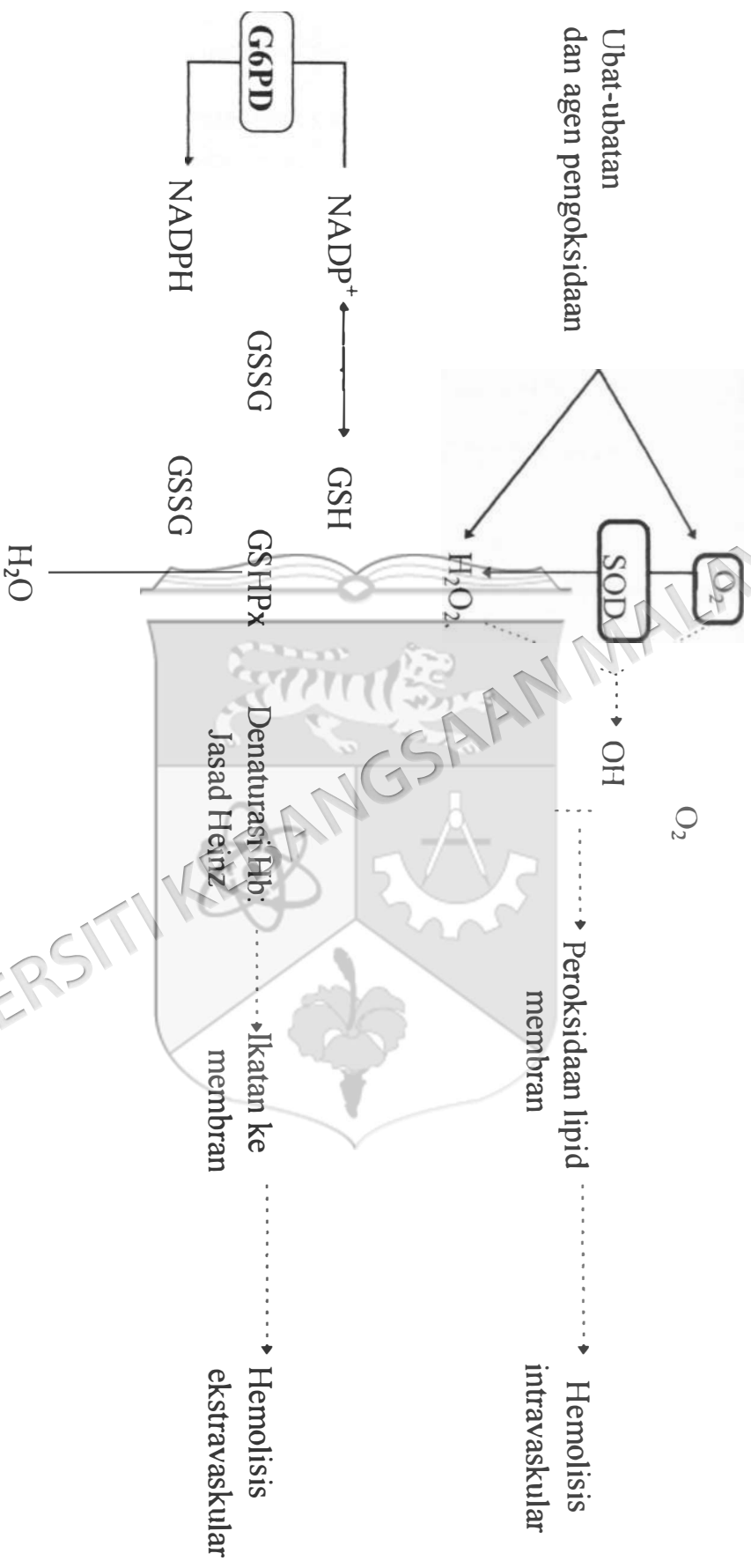
Sumber: WHO, 1985, hlm. 15



RAJAH 1.2 NADPH Dihasilkan Untuk Melindungi Eritrosit Daripada  
Pemusnahan oleh Superoksida dan Peroksida

*Sumber:* WHO, 1985, hlm. 16

Tanpa glutathione terturun, superoksida dan peroksida yang merupakan bahan oksidan kuat akan menimbun dan bertindak ke atas sebatian sulfidril pada membran hemoglobin dan sel darah merah. Ini akan menyebabkan kemusnahan pada sel-sel tersebut. Individu normal mempunyai enzim G6PD yang menghasilkan cukup NADPH untuk melindungi sel darah merahnya daripada kesan tekanan oksidan. Manusia sering terdedah pada bahan teroksida seperti makanan, ubat-ubatan dan bahan-bahan kimia. Rajah 1.3 menunjukkan mekanisme hemolisis pada sel yang kekurangan G6PD. Denaturasi hemoglobin dalam sel darah merah, di mana jasad Heinz terjadi, menyebabkan sel tersebut pecah di dalam sistem retikuloendotelial. Sebaliknya, peroksidaan lipid menyebabkan kemusnahan sel darah merah secara langsung. Walaupun mekanisme hemolisis masih kurang difahami, yang pasti ialah hemolisis intravaskular menyebabkan anemia hemolisis akut manakala hemolisis ekstravaskular menyebabkan anemia hemolitik tak sferositik kronik (HNSHA) (Dacie 1985; Alfinito *et al.* 1994).



RAJAH 1.3 Mekanisme Hemolisis pada Sel Kekurangan G6PD

Sumber: Dacie, 1985, hlm. 173

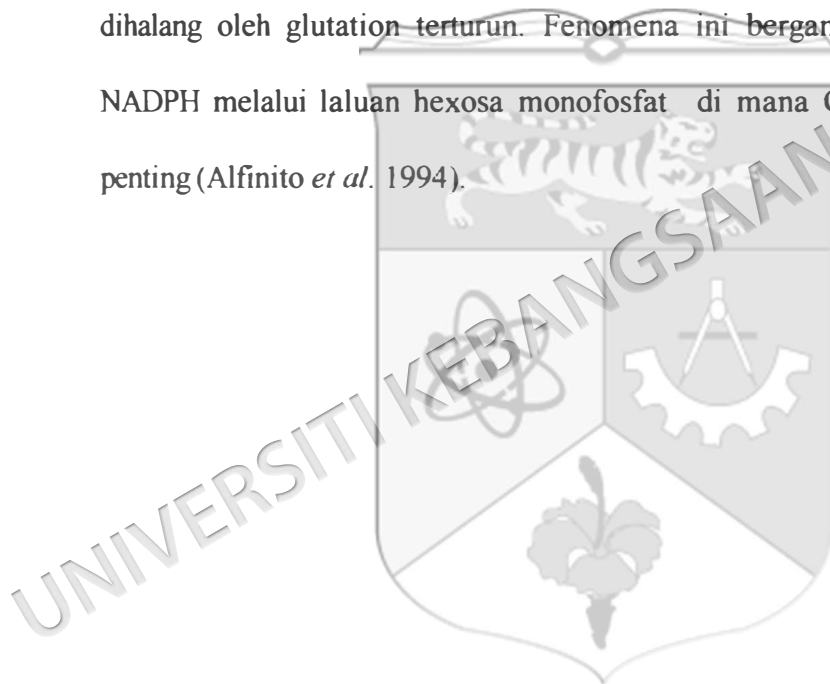


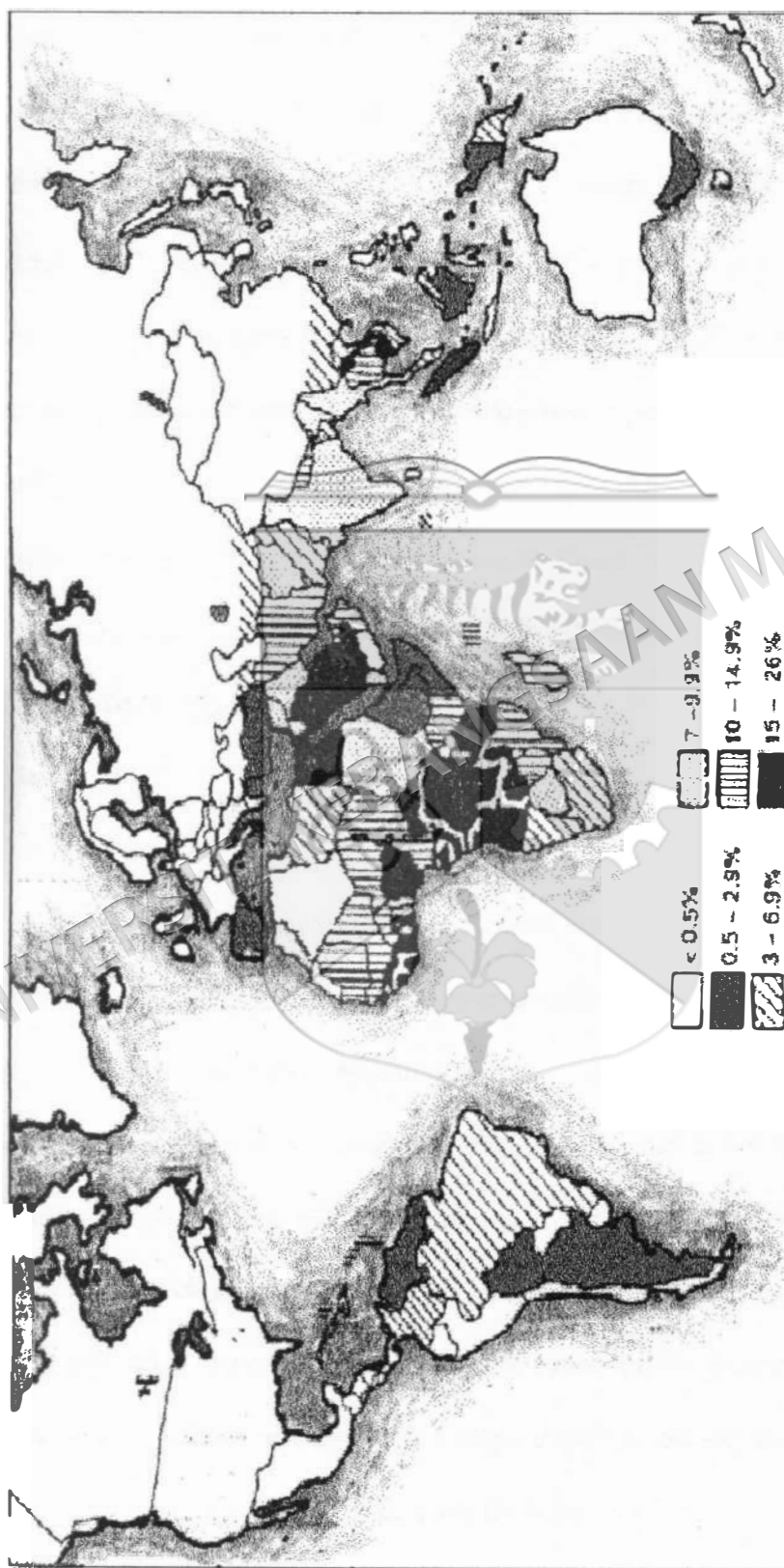
### 1.3 Keadaan Kekurangan G6PD

Keadaan kekurangan G6PD adalah penyakit keturunan yang sering berlaku pada manusia. Dianggarkan hampir 200 juta daripada penduduk dunia mengalami kekurangan ini (Beutler 1994). Rajah 1.4 berikut menunjukkan taburan geografi insidens kekurangan G6PD di seluruh dunia. Bahagian tengah benua Afrika mempunyai insidens kekurangan G6PD yang paling tinggi dan diikuti oleh Asia Barat. Dianggarkan 3 - 6.9% insidens kekurangan G6PD berlaku di Malaysia. Pada amnya, kebanyakan individu yang menghidapi kekurangan G6PD adalah sihat dan normal. Tetapi pada sesetengah individu kekurangan G6PD boleh menyebabkan anemia hemolitik apabila terdedah kepada bahan-bahan oksidatif yang terdapat pada sesetengah ubat, bahan kimia atau beberapa jenis makanan seperti kacang fava. Ianya juga penyebab utama jaundis neonatal yang boleh menyebabkan kernikterus dan seterusnya palsi serebral spastik (kecacatan otak). Sebahagian kecil daripada mereka ini berlaku anemia hemolitik tak sferositik (HNSHA) walaupun tanpa bahan-bahan oksidatif tersebut (WHO 1989).

Mekanisme terperinci mengenai kekurangan G6PD yang menyebabkan kemusnahan sel darah merah masih belum diketahui secara menyeluruh (Flora *et al.* 1974; Alfinito *et al.* 1994). Tetapi pada dasarnya, ianya adalah disebabkan oleh ketidakupayaan sel darah merah mengekalkan glutathione dalam bentuk terturun dan ini menghapuskan fungsinya sebagai pelindung tekanan oksidatif. Telah dibuktikan bahawa ubat yang mempunyai sifat oksidan boleh menghasilkan peroksida hidrogen dalam sel darah merah dan mengoksidakan glutathione. Proses pengoksidaan

glutation mungkin tertarik kepada hemoglobin; campuran kompleks hemoglobin disulfida-glutation adalah tidak stabil dan ini menyebabkan perubahan pada hemoglobin dan seterusnya menyebabkan pengoksidaan, denaturasi dan pemendakan hemoglobin di dalam sel. Mendakan akibat denaturasi hemoglobin dalam sel darah merah dikenali sebagai jasad Heinz. Penarikan jasad Heinz pada permukaan membran eritrosit menyebabkan hemolisis akibat daripada pemecahan membran tersebut. Bagi individu normal, pengambilan ubat pengoksida tidak menyebabkan proses tersebut sebab segala perubahan dalam sel darah merah dapat dihalang oleh glutathione terturun. Fenomena ini bergantung kepada penghasilan NADPH melalui laluan hexosa monofosfat di mana G6PD adalah enzim yang penting (Alfinito *et al.* 1994).





RAJAH 1.4 Taburan Geografi Insidens Kekurangan G6PD di Seluruh Dunia

Sumber: WHO, 1985, hlm. 5

### 1.3.1 Varian G6PD

Penyelidikan terhadap G6PD pada populasi yang berlainan menunjukkan terdapatnya varian genetik yang berbeza-beza (WHO 1967). Sesetengah varian dikaitkan dengan aktiviti enzim yang normal tetapi tidak menunjukkan sebarang manifestasi klinikal, contohnya G6PD-A (*GdA*) pada Negro. Terdapat kumpulan varian lain yang berkaitan dengan kekurangan aktiviti G6PD dan hemolisis apabila berlaku pendedahan terhadap bahan eksogenus seperti ubat dan kacang fava atau terdapat infeksi. Terdapat juga varian lain yang berkaitan dengan ketidakstabilan enzim yang teruk dan hemolisis kronik, di mana hemolisis berlaku sungguhpun tanpa kehadiran agen eksogenus; contohnya G6PD-Chicago dan G6PD-Oklahoma. Jadi, terdapat berjenis-jenis varian G6PD dengan pelbagai manifestasi klinikal (Beutler 1990).

Pada umumnya, setiap kumpulan etnik mempunyai varian G6PD yang tersendiri. Pencirian biokimia untuk menentukan varian G6PD termasuklah paras aktiviti enzim, pemalar Michaelis untuk substrat G6P ( $K_m$ -G6P), tahap penggunaan analog substrat 2-deoksi-G6P (2dG6P) dan deamino-NADP (dNADP), mobiliti protein secara elektroforesis, graf pH optimum dan kestabilan enzim (WHO 1967). Melalui pencirian biokimia, dipercayai terdapat hampir 442 varian yang telah dilaporkan di seluruh dunia (Beutler 1994). Pengenalan varian G6PD pada pesakit adalah penting kerana ianya dapat menolong situasi kritikal seperti apabila berlakunya episod anemia ataupun hemolisis.

Kaedah separa penulenan enzim perlu dilakukan terlebih dahulu sebelum menentukan pencirian kinetiknya (WHO 1967). Penulenan dapat mengasingkan hemoglobin, 6-fosfoglukonik dehidrogenase dan enzim-enzim lain yang mungkin akan memberikan gangguan pada tahap penyerapan semasa pencirian kinetik G6PD. Leukosit dan platelet pada umumnya mempunyai paras aktiviti G6PD yang lebih tinggi daripada eritrosit. Menurut Morelli *et al.* (1981), kehadiran leukosit dan platelet boleh menyebabkan peningkatan paras aktiviti G6PD diantara 0.003 ke 0.005 IU/g HB. Aktiviti enzim dalam sel-sel tersebut mungkin tidak terpengaruh walaupun eritrosit mengalami kekurangan G6PD (WHO 1967). Oleh itu, adalah perlu untuk menyediakan eritrosit yang tulen daripada sebarang pencemaran seberapa yang boleh.

Kewujudan varian yang berlainan pada kumpulan-kumpulan etnik di seluruh dunia telah dikenal pasti melalui kaedah untuk menentukan ciri biokimia dan juga keabnormalan gen. Varian-varian tersebut juga menunjukkan perbezaan pada sifat enzim dan paras aktiviti dalam sel darah merah. Parameter-parameter tersebut adalah penting untuk menentukan tahap keterukan atau manifestasi klinikal, terutamanya hemolisis akut, pada pesakit.

Varian G6PD jenis B ( $Gd^B+$ ) atau jenis barat (*western*) merupakan G6PD yang normal dan ditemui pada kebanyakan orang (Beutler 1994). Bagaimanapun pada orang Negro terdapat varian yang beraktiviti normal tetapi mempunyai pergerakan elektroforesis yang lebih cepat dan ini dikenali sebagai jenis A ( $Gd^A+$ ) (Beutler 1990). Saha *et al.* (1991) juga telah menemui varian

G6PD (*Gd*<sup>Singapore</sup>) yang beraktiviti normal dan juga menunjukkan mobiliti protein secara elektroforesis yang cepat pada kaum Melayu di Singapura. Varian G6PD-Hong Kong Pokfulam (Cina) pula mempunyai aktiviti G6PD yang kurang daripada 10% nilai normal dan mobiliti protein secara elektroforesis yang perlahan (Beutler 1990).

Penyelidikan yang intensif telah dilakukan terhadap mekanisme hemolisis yang berkaitan dengan kekurangan G6PD pada varian seperti *GdA*- dan G6PD-Mediterranean. Sel darah merah yang mengandungi fenotip *GdA*- mempunyai paras G6PD yang cukup semasa dikeluarkan dari tulang sum-sum, tetapi aktiviti enzim ini menurun apabila sel darah merah mulai musnah. Oleh itu, apabila mencapai sebulan, sel tersebut tidak lagi mengandungi G6PD. Apabila sel ini tertekan, seperti setelah memakan ubat pengoksida, sel yang telah agak tua dan tidak lagi mengandungi G6PD akan mengalami lisis, tetapi sel yang lebih muda masih dapat mempertahankan diri daripada tekanan ini dan kekal hidup; hanya sebahagian kecil sahaja daripada populasi sel darah merah akan hilang, dan anemia yang terhasil adalah kurang (Gruchy 1975).

Berlainan pula dengan G6PD-Mediterranean di mana ianya mempunyai enzim yang paling tak stabil. Oleh itu, aktiviti G6PD menjadi begitu kurang di dalam semua sel darah merah, termasuk juga dalam sel yang baru dikeluarkan dari tulang sum-sum. Ini menyebabkan semua sel darah merah rentan kepada hemolisis pengoksida, dan satu ancaman oksidatif yang cukup tinggi akan menyebabkan

hemolisis yang paling teruk. Seterusnya hemoglobinuria kasar dan hemoglobinemia pun berlaku, disusuli hematokritnya akan menurun kepada paras yang boleh mengancam nyawa. Sel darah merah yang kekurangan G6PD ini akan sentiasa berada di dalam aliran darah (Gruchy 1975).

Laporan Teknikal Pertubuhan Kesihatan Sedunia (WHO) pada tahun 1967 mengenai kekurangan G6PD banyak menyumbang kepada kemajuan dalam penyelidikan terutama sekali melalui kaedah piawaian yang telah disyor untuk menentukan varian enzim tersebut. Setelah hampir 28 tahun, banyak pembaharuan dan kemajuan yang dilakukan ke atas kaedah tersebut. Disamping itu, banyak pengetahuan dan penemuan baru samada dalam bidang klinikal, biokimia, dan genetik mengenai kekurangan G6PD yang telah diterokai.

Di Asia Tenggara, banyak penyelidikan ke atas varian-varian G6PD melalui pencirian biokimia telah dijalankan terutamanya di Filipina, Indonesia, Thailand dan Singapura (Kirkman *et al.* 1969; Yoshida *et al.* 1970; Panich *et al.* 1972, 1973; Saha *et al.* 1990, 1991). Namun, masih belum terdapat penyelidikan pencirian biokimia varian G6PD dijalankan di Malaysia. Normah *et al.* (1991) telah melaporkan mengenai aktiviti G6PD di kalangan kaum Melayu Kelantan. Boo *et al.* (1994, 1995) juga telah mengorak langkah ke arah penyelidikan pencirian biokimia dengan melaporkan mengenai aktiviti G6PD pada neonat di kalangan etnik di Malaysia. Banyak lagi penyelidikan mengenai kekurangan G6PD yang telah dijalankan di Malaysia, namun hampir kesemuanya hanya melaporkan

tentang insidens dan kaitannya dengan jaundis atau favisme (Lie-Injo *et al.* 1964, 1977; Singh 1986; Alex *et al.* 1989; Ariffin *et al.* 1990).

#### 1.4 Perspektif Klinikal

Mengikut kategori yang telah disyorkan oleh WHO (1967), yang berdasarkan kepada tahap kekurangan aktiviti enzim dan manifestasi klinikal, kekurangan G6PD boleh dikelaskan kepada lima kumpulan:

- I. Mengalami kekurangan G6PD yang teruk dan dikaitkan dengan anemia hemolitik tak sferositik kronik (HNSHA).
- II. Aktiviti enzim kurang 10% daripada normal tetapi tidak dikaitkan dengan hemolisis kronik seperti G6PD-Mediterranean.
- III. Aktiviti enzim adalah 10 - 60% daripada normal dan tidak dikaitkan dengan hemolisis kronik seperti G6PD-A<sup>-</sup> (GdA<sup>-</sup>).
- IV. Aktiviti enzim adalah dalam lingkungan normal (60% - 150%).
- V. Aktiviti enzim meningkat (lebih daripada 150%).

Individu yang berada di dalam kelas IV dan V tidak menunjukkan sebarang masalah klinikal.

Kekurangan G6PD adalah salah satu daripada penyebab utama jaundis neonatal yang boleh menyebabkan kernikterus, palsy selebral spastik ataupun kematian terutama sekali pada varian G6PD di Asia (Wong *et al.* 1975; Singh 1986). Ianya juga boleh menyebabkan krisis hemolitik sepanjang hidup pada



kanak-kanak dan seterusnya ke dewasa apabila mengambil ubat tertentu atau memakan kacang fava.

Kebanyakan wanita yang bersifat heterozigot tidak menunjukkan sebarang kecacatan dari segi hematologi. Hemolisis kronik yang sederhana akan terjadi pada lelaki hemizigot yang mempunyai varian *GdA*- dan G6PD-Mediterranean. Tanda-tanda dan gejala yang sering ditemui pada pesakit yang menghadapi kekurangan G6PD ialah hemolisis (selalunya berepisod dan kadangkala kronik) yang terutamanya pada intravaskular, pembesaran limpa dan kalkulus hempedu (Beutler 1994).

#### 1.4.1 Jaundis Neonatal

Jaundis neonatal sering berlaku pada kes kekurangan G6PD di Asia dan tidak pada kes kekurangan G6PD di Afrika atau di Mediterranean (Beutler 1994). Hubungkait diantara jaundis neonatal dan kekurangan G6PD masih belum diketahui secara terperinci kerana kesemua bayi yang baru dilahirkan mengalami jaundis. Jaundis neonatal boleh disebabkan oleh faktor-faktor seperti genetik, eksogenus dan budaya. Berikut adalah faktor-faktor yang boleh menyebabkan jaundis neonatal (WHO 1989):

- a) Keadaan semulajadi varian tertentu dan paras aktiviti G6PD dalam hati.

- b) Genetik seperti genetik terhadap pematangan yang lebih lambat pada enzim-enzim hati pada bayi di Asia berbanding dengan bayi di Eropah.
- c) Faktor-faktor eksogenus seperti kematangan bayi. Jaundis neonatal adalah teruk dan merbahaya pada bayi yang dilahirkan tidak cukup bulan. Cara penyusuan juga menjadi faktor utama kerana jaundis adalah lebih kerap didapati pada bayi yang diberikan susu ibu.
- d) Pendedahan bayi kepada agen persekitaran seperti kain baju yang disimpan bersama-sama ubat gegat (naftalena), ubat herba ataupun korda umbilikal yang disapu dengan bedak antiseptik bermentol.
- e) Kekerapan infeksi seperti sepsis umbilikal boleh menyebabkan jaundis neonatal pada bayi yang baru dilahirkan.
- f) Pengambilan agen-agen yang boleh menyebabkan hemolisis seperti kacang fava, ubat-ubatan tertentu dan herba oleh ibu heterozigot semasa mengandung. Faktor hemolisis mungkin berpindah kepada fetus melalui darah ibu atau susunya pada bayi yang dilahirkan.

Semua neonat, terutamanya yang pramatang, didapati agak sensitif terhadap ubat yang menyebabkan hemolisis seperti naftalena dan vitamin-K. Ini mungkin disebabkan oleh glutathione terturun (GSH) yang tidak stabil pada masa 2 ke 3 hari selepas kelahiran walaupun paras G6PD adalah normal. Namun masih belum diketahui faktor-faktor yang menyebabkan kekerapan dan keterukan jaundis neonatal yang berkaitan dengan kekurangan G6PD (Beutler 1991).

#### 1.4.2 Favisme

Keadaan ini dikaitkan dengan hemolisis akut pada pesakit yang menghidapi kekurangan G6PD apabila memakan kacang fava (*Vicia faba*) atau lebih dikenali sebagai kacang parang. Tanda-tanda lain yang ketara termasuklah keputatan (palor) teruk yang berlaku dengan serta merta yang disertai oleh jaundis dan hemoglobinuria. Ianya adalah lebih kerap terjadi pada kanak-kanak yang berumur kurang daripada 5 tahun dan agak kurang pada orang dewasa (Kattamis 1969). Hemolisis biasanya berlaku 1 ke 2 hari selepas pengambilan kacang fava. Favisme lebih kerap dihubungkan dengan G6PD-Mediterranean dan beberapa varian lain seperti G6PD-Union (Thai), G6PD-Bielefeld (Jerman), dan G6PD-Canton (Cina) (Dacie 1985; WHO 1985).

Kacang fava yang masih mentah didapati memberikan kesan yang lebih serius apabila dimakan berbanding dengan yang telah direbus atau dimasak (Kattamis 1969). Gejala awal berlaku 5 ke 24 jam selepas pengambilan kacang ini di mana pesakit merasa tidak enak badan (malais atau dedar), pening, dan loya (*nausea*) berlaku diikuti oleh muntah, rasa seram sejuk (*chillness*) dituruti oleh pireksia (*pyrexia*) dan sakit di bahagian lumbar. Akhirnya hemolisis akut terjadi (Dacie 1985). Disamping itu, hemoglobinuria mungkin berlarutan selama beberapa hari (Beutler 1994).

Persoalan berkaitan dengan bagaimana favisme boleh berlaku masih menjadi tanda tanya. Antara kemungkinannya ialah penyerapan bahan toksik

(mungkin  $\beta$ -glukosida dari pirimidina) daripada kacang fava (Beutler 1994). Kadar penyerapan atau metabolisme bahan toksik pada individu yang berbeza-beza berkemungkinan juga mempengaruhi favisme. Kekerapan favisme pada kanak-kanak mungkin disebabkan perbezaan terhadap metabolisme diantara kanak-kanak dan dewasa. Faktor genetik dan mekanisme imun juga berperanan dalam menentukan favisme pada sesetengah individu yang menghadapi kekurangan G6PD (Dacie 1985).

#### 1.4.3 Anemia Hemolitik Akut

Anemia hemolitik ialah sejenis anemia yang terjadi akibat peningkatan kemusnahan sel darah merah. Namun begitu, anemia sendiri bukanlah suatu penyakit tetapi sebenarnya hanya sebagai tanda penyakit (Dacie 1985).

Pesakit yang menghadapi kekurangan G6PD adalah terdedah kepada bahaya penyakit iatrogenik. G6PD telah ditemui melalui penyelidikan mengenai anemia cetusan hemolitik yang disebabkan oleh ubat antimalaria primaquine pada askar Negro-Amerika semasa Perang Dunia ke-2. Semenjak itu, banyak lagi ubat-ubatan yang didapati mengakibatkan anemia hemolitik pada pesakit yang menghadapi kekurangan G6PD (Dacie 1985).

Gambaran klinikal berkaitan dengan hemolisis adalah bergantung kepada kedosan daripada sederhana ke teruk. Ini ditunjukkan oleh hemoglobinuria dan keadaan hemolisis intravaskular berlainan. Hemolisis juga dikaitkan dengan

leukositosis terutamanya disebabkan dengan peningkatan polimorfonukleus neutrofil. Secara klinikal, sesetengah pesakit mempunyai air kencing yang kehitaman. Bagi keadaan yang lebih serius mereka menunjukkan kepenatan, sakit belakang dan abdomen, jaundis dan demam (Gruchy 1975).

Pada masa kini, pengetahuan mengenai yang sesiapa yang akan mengalami hemolisis atau tidak selepas pengambilan ubat yang sama pada seseorang yang menghadapi kekurangan G6PD masih tidak diketahui. Begitu juga terhadap seseorang yang menghadapi kekurangan G6PD iaitu mengapa hemolisis berlaku pada masa tertentu tetapi tidak pada masa yang lain (Alfinito *et al.* 1994). Fenomena ini mungkin disebabkan oleh varian G6PD yang berlainan, perbezaan genetik dalam sel darah merah ataupun dalam organ yang lain seperti hati atau disebabkan oleh sesuatu di persekitaran.

Walaupun mekanisme pemusnahan sel darah merah semasa krisis hemolisis masih belum diketahui sepenuhnya, namun kemusnahan ini menyebabkan pemendakan hemoglobin yang membentuk jasad Heinz. Ini menyebabkan sel darah merah terperangkap dalam limpa dan memusnahkannya (Gruchy 1975).

#### **1.4.4 Anemia Hemolitik Tak Sferositik Keturunan (HNSHA)**

Kekurangan G6PD telah dikenalpasti sebagai penyebab utama kepada HNSHA atau anemia hemolitik yang berpanjangan. Pada ramai pesakit, peningkatan

hemolisis adalah jelas semasa tempoh neonat (kurang daripada 4 minggu kelahiran). Jaundis akan bertambah serius setelah beberapa hari kelahiran dan transfusi darah perlu dilakukan dengan segera. Namun bagi sesetengah pesakit yang menghadapi hemolisis adalah kurang serius dan diagnosis terhadap anemia hemolitik kronik dan biokimianya dibuat setelah pesakit mencapai dewasa (Dacie 1985).

HNSHA kronik yang disebabkan oleh kekurangan G6PD tidak mempunyai ciri-ciri tanda yang tertentu. Hanya pemeriksaan fizikal boleh memberikan tanda berkaitan dengan anemia hemolitik kronik. Limpa mungkin kelihatan membesar sedikit atau sederhana besar, tetapi ianya mungkin kurang jelas. Hepar adalah normal; kalkulus hempedu (*gallstones*) mungkin berlaku. Neutrofil pada masa krisis hemolitik atau anemia adalah normal atau meningkat. Begitu juga bagi platelet, terutamanya selepas splenektomi (Dacie 1985).

#### **1.4.5 Pengaruh Faktor-Faktor Lain**

Pengaruh faktor-faktor lain seperti infeksi, asidosis diabetes, dan gangguan ginjal boleh memberikan perspektif klinikal terhadap pesakit kekurangan G6PD (Beutler 1994). Kebanyakan infeksi, termasuklah yang disebabkan oleh bakteria dan virus, akan menyebabkan hemolisis pada pesakit yang peka walaupun tanpa pengambilan ubat-ubatan; ini termasuklah hepatitis dan tifoid. Hemolisis yang disebabkan oleh infeksi sahaja tanpa pengambilan ubat pada kebiasaannya adalah tidak berapa serius. Adakalanya kegagalan ginjal untuk berfungsi dengan baik akan menambah

komplikasi. Asidosis diabetes juga mungkin boleh menyebabkan krisis hemolisis (Gruchy 1975; Dacie 1985; Beutler 1994).

Penyebab yang meningkatkan hemolisis pada masa virus hepatitis, walaupun tanpa pengambilan ubat, masih kurang jelas. Ini mungkin disebabkan oleh gangguan fungsi hepar yang menyebabkan kegagalan proses detoksikan bahan kimia yang boleh menyebabkan hemolisis (Dacie 1985). Disamping itu, individu yang menghadapi kekurangan G6PD menunjukkan tekanan sistolik dan diastolik yang sedikit tinggi. Dengutan nadi dan paras kreatin serum juga menunjukkan peningkatan bagi pesakit kekurangan G6PD (Dacie 1985).

### 1.5 Penemuan Hematologi

Morfologi darah pada pesakit yang menghadapi kekurangan G6PD apabila tidak terdedah kepada bahan oxidan adalah normal. Morfologi sel darah merah, ujian fragiliti osmotik dan jenis hemoglobin adalah normal. Ujian antiglobulin (*Coombs*) secara langsung atau tidak juga adalah negatif. Juga tiada kaitan langsung diantara kumpulan darah dengan kekurangan G6PD (Vulliamy 1993).

Semasa berlakunya hemolisis, sel darah merah menunjukkan sedikit anisositosis, polikromatofilia dan basofilik berbintik; sferositosis mungkin berlaku bersama pemecahan sel darah merah. Jasad Heinz (hemoglobin yang teroksida dan terdenaturasi) dapat dilihat pada 1 hingga 2 hari selepas pengambilan ubat dan peningkatan hemolisis berlaku dengan secara mendadak. Filem darah mungkin

akan menunjukkan sel yang mengecut dan pecah, sel gigit (*bite cell*) dan sel repuh (*blister cell*) semasa berlakunya krisis hemolisis (Kattamis 1969; Beutler 1990).

## 1.6 Penemuan Genetik

Pengklonan dan rangkaian gen G6PD telah berjaya dilakukan oleh Persico dan rakan-rakan (Beutler 1994). Gen G6PD terdiri daripada 13 ekson dan lebih 20 kb panjangnya dengan 515 asid amino (Beutler 1994). Kedudukan gen yang mengkodkan G6PD terletak di kromosom X. Varian G6PD didapati mempunyai penggantian pada satu asid amino akibat daripada mutasi pasangan asal di dalam struktur gen G6PD. Lebih separuh daripada mutasi G6PD akan menggantikan satu asid amino dengan yang mempunyai kutub yang sama. Oleh itu terdapat varian G6PD yang tidak dapat dikesan secara elektroforesis tetapi dapat dikesan melalui sedikit kelainan pada aktiviti enzim atau sifat kinetiknya (Beutler 1991).

Beutler (1991) menyatakan bahawa keterukan penyakit kekurangan G6PD disebabkan oleh mutasi yang berdekatan dengan tapak pengikat bagi  $\text{NADP}^+$  dan glukosa-6-fosfat (G6P). Bagi mutasi yang menyebabkan HNSHA kebanyakannya adalah bertumpu di bahagian antara asid amino 362 dan 446. Manakala keterukan yang sederhana pula adalah disebabkan oleh mutasi yang berdekatan dengan bahagian penghujung asid amino pada enzim. Walaupun penggantian pada nukleotid (nt) 1376 dan pada nt 1388 tidak terletak berhampiran tapak pengikat  $\text{NADP}^+$ , kedudukan mereka yang berdekatan dengan kawasan ini (ekson 12) mungkin mempengaruhi kadar kinetik G6PD di mana individu yang



mempunyai penggantian ini (nt 1376 dan nt 1388) adalah suseptibel kepada krisis hemolisis cetusan-kimia (Beutler 1991).

Berlainan pula dijumpai pada varian  $Gd^A$  dan varian  $Gd^A-$  yang terjadi pada kebanyakan orang Afrika di mana mutasi terletak berjauhan daripada tapak pengikat  $NADP^+$  ke arah penghujung asid amino G6PD (Vulliamy 1993). Walaupun keadaan semulajadi terhadap mutasi boleh menjadi penentu terhadap keterukan klinikal pada kekurangan G6PD, namun begitu faktor-faktor lain seperti pemakanan, keadaan persekitaran, dan faktor genetik mungkin berperanan dalam fisiologi kekurangan G6PD (Beutler 1991).

#### 1.6.1 Pertalian X

Kekurangan G6PD merupakan penyakit keturunan yang ada kaitan dengan kromosom X, dan gen pertalian seks (*sex linked*) di mana lelaki adalah pengidap, manakala perempuan adalah pembawa kerana perempuan mempunyai dua kromosom X (Trent 1993). Gangguan pertalian X berlaku kerana keabnormalan fungsi gen yang berkaitan dengan kromosom X. Lelaki yang mempunyai satu kromosom X (hemizigot) akan menerima gangguan pertalian X sepenuhnya apabila ibu mereka adalah pembawa gen kekurangan G6PD. Walaupun perempuan mempunyai dua kromosom X, hasil daripadanya secara kuantitatif adalah sama pada kedua-dua jantina. Oleh itu, salah satu daripada kromosom X pada perempuan mestilah tidak aktif. Bagaimanapun, bagi perempuan yang homozigos di mana kedua-dua kromosomnya (XX) mempunyai mutan terhadap gen G6PD,

mereka juga menunjukkan kekurangan enzim tersebut iaitu seperti lelaki hemozigot. Ini terjadi kerana ibunya adalah pembawa sementara bapanya juga mengalami kekurangan G6PD.

### 1.6.2 Heterozigot

Kedualan populasi dalam perempuan heterozigot ini dikenali sebagai mosaikisme. Hasil daripada mosaikisme ini, perempuan heterozigot, mungkin menunjukkan hemolisis yang kurang daripada lelaki yang kekurangan G6PD. Mosaikisme adalah hasil daripada satu fakta pada awal embriogenesis pada perempuan di mana satu daripada dua kromosom X kehilangan keupayaannya terhadap mengekod sintesis protein. Kehilangan fungsi ini dikenali sebagai pentakaktifan kromosom X yang berlaku secara rawak. Secara ringkasnya, pada perempuan heterozigot, dalam setiap sel hanya salah satu daripada dua gen G6PD yang aktif (Trent 1993).

Lionisasi menerangkan keadaan pentakaktifan-X pada salah satu daripada kromosom X perempuan secara rawak. Ini berlaku semasa perkembangan embrionik. Walaubagaimanapun, setelah pentakaktifan berlaku corak pentakaktifan menjadi tetap. Oleh kerana itu, perempuan menjadi pembawa kepada gangguan pertalian X dan boleh memberikan pelbagai hasil gen yang bergantung kepada normal atau mutan kromosom X yang berfungsi. Jika ketidakseimbangan bilangan kromosom X yang normal telah ditakaktifkan, ini mungkin menyebabkan translokasi diantara kromosom X dengan autosom. Dalam situasi ini, pentakaktifan-X didapati berlaku secara tidak rawak kerana kromosom

X yang normal ditakaktifkan. Anak lelaki kepada ibu pembawa (heterozigot) mempunyai kemungkinan 50:50 terhadap mewarisi kromosom cacat tersebut. Dia akan menghadapi penyakit yang berbentuk penuh kerana kromosom X yang diterima daripada ibunya hanya kromosom cacat. Sebaliknya, anak perempuan yang mewarisi kromosom yang cacat itu adalah normal dari segi klinikal, atau menghadapi penyakit yang ringan sahaja, kerana dia akan mewarisi satu lagi kromosom X daripada bapa yang boleh memampas kecacatan ini. Namun begitu, anak perempuan akan menjadi pembawa mutan gen G6PD (Beutler 1969; Motulsky 1969).

### 1.7 **Diagnosis dan Rawatan Kekurangan G6PD**

Langkah pertama terhadap rawatan penyakit kekurangan G6PD ialah penentuan diagnosis yang betul dan kategori penyakit tersebut tergolong (Wilkinson 1976). Ini biasanya boleh ditentukan secara pengambilan kira bangsa atau keturunan, sejarah keluarga dan sendiri - terutamanya berkaitan dengan anemia kronik, anemia atau jaundis selepas pengambilan ubat tertentu. Setelah diagnosis diketahui melalui ujian penyaringan dan kuantitatif terhadap G6PD, nasihat dan panduan perlu diberikan kepada pesakit.

Penentuan enzim adalah penting untuk menetapkan samada seseorang menghadapi kekurangan G6PD. Ujian penyaringan merupakan suatu ujian yang mesti dijalankan ke atas bayi yang dilahirkan. Ujian ini boleh dilakukan dengan mudah dan tidak memerlukan kepakaran serta peralatan yang canggih.

Pada pesakit yang menghadapi kekurangan G6PD yang serius, masa di mana ujian dijalankan adalah tidak penting. Akan tetapi, bagi mereka yang menghadapi penyakit yang kurang atau sederhana serius, terutamanya bagi heterozigot, masa di mana ujian dijalankan adalah penting. Sel darah yang masih baru mempunyai paras aktiviti G6PD yang lebih tinggi berbanding dengan sel yang telah matang. Peningkatan sel darah baru semasa episod hemolitik pada pesakit mungkin memberikan paras aktiviti normal palsu (*false normal*). Oleh itu, ujian hendaklah diulangi 2 ke 4 bulan selepas episod hemolitik pada pesakit yang telah dijangkakan menghadapi kekurangan G6PD, walaupun keputusan menunjukkan paras aktiviti yang normal semasa atau sebaik sahaja selepas hemolisis (Gruchy 1975).

Pada pesakit yang tidak mengalami peningkatan hemolisis kecuali dalam situasi yang tertentu seperti akibat pengambilan ubat tertentu atau memakan kacang fava atau semasa infeksi, pencegahannya adalah mudah sahaja; jauhi daripada ubat yang boleh menyebabkan keburukan (Lampiran A) dan elakkan memakan kacang fava. Pada pesakit yang didapati mengalami krisis hemolisis yang serius, transfusi darah hendaklah diberikan. Namun adalah perlu diingatkan bahawa darah yang diberi tidaklah daripada penderma yang juga menghadapi kekurangan G6PD. Oleh itu, penderma darah perlulah menjalani ujian penyaringan G6PD terlebih dahulu (WHO 1967).

Beberapa terapi telah disyorkan untuk mengatasi masalah kemusnahan eritrosit. Salah satu daripadanya ialah pemberian xilitol atau isositrat yang

berfungsi sebagai substrat untuk penurunan  $\text{NADP}^+$  (Wang *et al.* 1971; Wang *et al.* 1974). Akan tetapi menurut Beutler (1978) terapi ini tidak memberi bukti yang berjaya secara klinikal. Askorbat juga digunakan sebagai substrat dalam terapi kekurangan G6PD ini. Asid askorbik dalam kuantiti yang tinggi mungkin merbahaya kepada manusia tetapi kepekatan yang rendah didapati melindungi sel kekurangan G6PD daripada pengoksida-cetusan asetil fenilhidrazine (Flora *et al.* 1974).

Komplikasi kekurangan G6PD, pada umumnya, dapat dibendung melalui penerangan dan pendidikan. Disamping itu, jaundis neonat dapat dikawal secara fototerapi di mana ianya adalah mudah, murah dan bersesuaian sebagai pengawalan pada peringkat awal kelahiran. Namun, rawatan yang terbaik ialah mengelakkan daripada memberi ubat serta bahan yang boleh menyebabkan stres pengoksidaan pada eritrosit. Transfusi darah perlu dilakukan untuk menyelamatkan nyawa pesakit jika berlakunya anemia yang teruk.

## 1.8 G6PD di Malaysia

Keadaan kekurangan G6PD merupakan suatu kelainan keturunan yang sering berlaku di Malaysia. Buat masa ini, keadaan kekurangan G6PD dikesan secara rutin dengan ujian penyaringan titik pendarfluor di hospital-hospital bersalin ke atas bayi baru lahir. Di Malaysia, kajian melalui ujian penyaringan ini menunjukkan insiden keadaan kekurangan G6PD ialah 3.1% bagi lelaki dan 1.6% bagi perempuan (Singh 1986). Namun begitu, ujian penyaringan titik pendarfluor

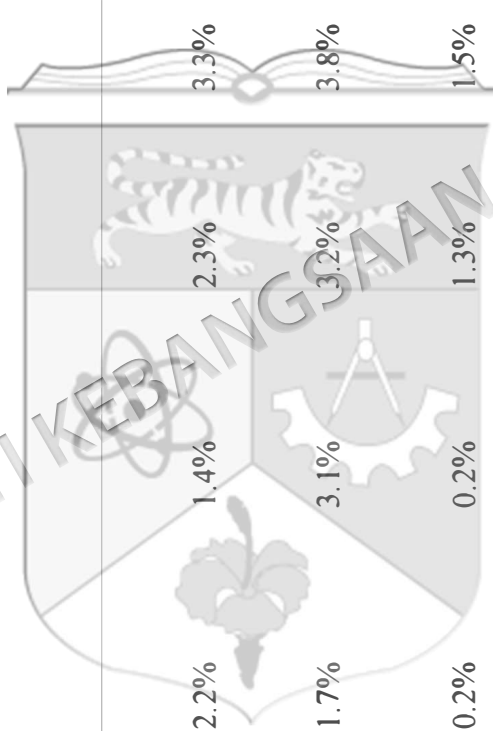
yang dijalankan buat masa ini di kebanyakan hospital di negara ini boleh memberikan keputusan normal yang palsu dan tidak tepat terutama sekali bagi bayi perempuan yang heterozigot (Boo *et al.* 1995).

Seperti yang telah dibuktikan melalui ujian penyaringan titik pendarfluor, insiden kekurangan G6PD adalah tinggi di kalangan kaum Cina dan Melayu. Insiden kekurangan G6PD pada kaum India adalah rendah. Jadual 1.1 menunjukkan laporan-laporan jurnal mengenai insiden tersebut. Oleh sebab itu, projek ini hanya dilakukan pada sampel kedua-dua kumpulan etnik Melayu dan Cina.



JADUAL 1.1 Insiden Kekurangan G6PD yang Pernah Dilaporkan di Malaysia.

| Etnik  | Wong <i>et al.</i><br>(1975) | Robinson <i>et al.</i><br>(1975) | Singh<br>(1986) | Singh<br>(1986) | Alex <i>et al.</i><br>(1985) |
|--------|------------------------------|----------------------------------|-----------------|-----------------|------------------------------|
| Melayu | 2.2%                         | 1.4%                             | 2.3%            | 3.3%            | 3.5%                         |
| Cina   | 1.7%                         | 3.1%                             | 3.2%            | 3.8%            | 4.5%                         |
| India  | 0.2%                         | 0.2%                             | 1.3%            | 1.5%            | 1.5%                         |



Banyak kajian ke atas aktiviti dan pencirian biokimia enzim ini yang telah dilakukan di negara-negara Asia Tenggara yang lain seperti di Indonesia, Thailand, Singapura dan Filipina (Kirkman *et al.* 1969; ; Yoshida *et al.* 1970; Panich *et al.* 1972, 1973, 1980; Saha *et al.* 1971b, 1991) menunjukkan terdapatnya varian G6PD. Sebagai contohnya, di Tanah Besar Cina sahaja terdapat hampir 30 varian G6PD yang telah dikenalpasti melalui pencirian biokimia (Lo *et al.* 1994). Akan tetapi di Malaysia hanya kajian insidens kekurangan G6PD dan kaitan dengan jaundis neonatal dan favisme telah dilakukan setakat ini (Lie-Injo *et al.* 1964, 1977; Singh 1986; Alex *et al.* 1989; Ariffin *et al.* 1990). Belum ada kajian mengenai kewujudan varian G6PD dilakukan di negara ini.

### 1.9 Objektif Penyelidikan

Objektif utama projek ini adalah untuk memperkembangkan kaedah kuantitatif, iaitu kaedah esei aktiviti G6PD dan kaedah pencirian biokimia, untuk diagnosis kekurangan G6PD. Seterusnya projek ini bertujuan untuk membandingkan kesensitifan mengesan kes kekurangan G6PD antara kaedah ujian penyaringan titik pendarfluor dengan ujian esei aktiviti G6PD. Objektif yang ketiga adalah untuk menentukan julat normal aktiviti G6PD pada kumpulan etnik mengikut umur dan jantina. Objektif seterusnya adalah untuk mengenalpasti varian G6PD yang terdapat pada kaum Melayu dan kaum Cina di Malaysia. Akhir sekali adalah untuk menghubungkan antara tahap aktiviti enzim dan jenis varian G6PD dengan gambaran klinikal.



## RUJUKAN

- Ainoon, O., Joyce, J., Boo, N.Y., Cheong S.K., Zainal, Z.A., Hamidah, N.H. 1995. Nucleotide 1376 G→T Mutation in G6PD-deficient Chinese in Malaysia. *Malaysian J. Pathol.* **17**(2):61-5
- Alex, T.T.H, Balakrisnan, S. & Zamri Ahmad. 1989. Hyperbilirubinemia & Erythrocytic Glucose-6-Phosphate Deficiency in Malaysian Children. *Med. J. Malaysia.* **44**(1):30-4
- Alfinito, A., Calabro, V., Cappellini, M.D., Fiorelli, G., Filosa, S., Iolascon, A., Miraglia del Giudice, E., Perotta, S., Migliorati, R., Vallone, D., Rotoli, B. & Luzatto, L. 1994. Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Deficiency & Red Cell Membrane Defects: Additive or Synergistic Interaction in Producing Chronic Haemolytic Anaemia. *Br. J. Haematol.* **87**: 148-52
- Ariffin, W.A., Oppenheimer, S.J., Septhiah, M., Ee, C.K., Jamaludin, Z..N. & Zakaria, R. 1990. Favism in Malays. *J. Paed. & Child Health* **26**:306
- Beutler, E., Mathai, C.K., Smith, J.E. 1968. Biochemical Variants Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Giving Rise to Congenital Nonspherocytic Hemolytic Disease. *Blood* **31**(2):131-50
- Beutler, E. 1969. G6PD Activity of Individual Erythrocytes & X-Chromosomal Inactivation. Dlm Jorge J. Yunis (pnyt.). *Biochemical Methods in Red Cell Genetics*: 95-113. New York: Academic Press.
- Beutler, E., 1976. The Removal of Leukocytes & Platelets from Whole Blood. *J. Lab. Clin. Med.* **88**(2): 323-33
- Beutler, E., Blume, K.G., Kaplan, J.C., Lohr, G.W., Ramot, B., Valentine, W.N. 1977. International Committee for Standardization in Haematology: Recommended Methods for Red-Cell Enzyme Analysis. *Br. J. Haem.* **35**: 331-40

- Beutler, E., 1978. Hemolytic Anemia in Disorders of Red Cell Metabolism. New York, NY: Plenum.
- Beutler, E., Hartman, K., Gelbart, T., & Forman, L. 1986. G6PD WALTER REED: Possible Insight into "Structural" NADP in G6PD. *Am. J. Hematol.* **23**: 25-30
- Beutler, E. 1990. The Genetics of Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Deficiency. *Seminar in Hematology* **27**(2):137-64
- Beutler, E. 1991. Ed. Jane F. Desforges. G6PD Deficiency : Current Concepts. *N. Engl. J. Med.* **324**:169-74
- Beutler, E. 1994. G6PD Deficiency. *Blood.* **84**(11):3613-36
- Boo, N.Y., Ainoon, B.O., Ooi, L.H., Cheong, S.K., Haliza, B.M.S., 1994. Glucose-6-phosphate dehydrogenase enzyme activity of normal term Malaysian neonates of different ethnic origins. *J. Paediatr. & Child Health* **30**: 50-2
- Boo, N.Y., B.O. Ainoon, B.Z.A. Zainal Arif, S.K. Cheong, B.M.S. Haliza, 1995. Enzyme Activity and Hyperbilirubinemia of Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase-Deficient Malaysian Neonates During First 10 Days of Life. *J. Paediatr. & Child Health* **31**(1):44-6
- Chan, T.K., Todd D. 1972. Characteristics and Distribution of Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase - Deficient Variants in South China. *Amer. J. Hum. Genet.* **24**:475-84
- Chiu, D.T.Y., Zuo, L., Chao, L., Chan, E., Louie, E., Lubin, B., Liu, T.Z. & Du, C.S. 1993. Molecular Characterisation of Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase (G6PD) Deficiency in Patients of Chinese Descent & Identification of New Base Substitutions in the Human G6PD Gene. *Blood* **81**(8):2150-4
- Cohen, P., Rosemeyer, M.A. 1969a. Human Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase: Purification of Erythrocyte Enzyme and the Influence of Ions on its Activity. *Europ. J. Biochem.* **8**:1-7

- Cohen, P., Rosemeyer, M.A. 1969b. Subunit Interactions of Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase from Human Erythrocytes. *Europ. J. Biochem.* **8**:8-15
- Dacie, S.J. 1985. Ed. ke-3. The Haemolytic Anaemia. 1 jil. The Hereditary Haemolytic Anaemias. 1 fs. Hereditary enzyme-deficiency haemolytic anaemias III: deficiency of glucose-6-phosphate dehydrogenase. 364-418:New York: Churchill Livingstone Inc.
- Flora, A.D., Morelli, A., Benatti, U., Giuliano, F., & Molinari, M.P. 1974. Human Erythrocyte Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Interaction with Oxidized and Reduced Coenzyme. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **60**(3):999-1005
- Gruchy, G.C. de. 1975. *Drug-Induced Blood Disorders*. Haemolytic Anemia: 156-82. Oxford: Blackwell Scientific Publ.
- Helena Laboratory. Prot. 14 Rev. 1/85 (2). G6PD : Electrophoresis Procedure.
- Hirono, A., Miwa, S. 1993. Human G6PD: Structure and Function of Normal & Variant Enzymes. *Haematologica.* **25**(2):85-97
- Joginder Singh , 1980. *Malaysia, Singapura dan Brunai 1400-1965*. Singapore: Longman Malaysia Sdn. Bhd.
- Kattamis, C.A., 1969. Favism : Clinical and Biochemical Data. *J. Med. Genet.* **6**:34-41
- Kirkman, H.N., Lie-Injo, L.E. 1969. Variants of Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase in Indonesia. *Nature.* **221**:959-60
- Lab. Hematol. An Account of Laboratory Techniques. London: Churchill Livingstone Pub. p. 106-8
- Lie-Injo, L.E., & James Chin. 1964. Abnormal Haemoglobin & G6PD Deficiency in Malayan Aborigines. *Nature.* **204**:291-2

- Lie-Injo, L.E., Virik, H.K., Lim, P.W., Lie, A.K., & Ganesan, J. 1977. Red Cell Metabolism and Severe Neonatal Jaundice in West Malaysia. *Acta. Haematol.* **58**:152-60
- Lytt I. Gardner. (pnyt.) 1961. *Molecular Genetics & Human Disease*. Illinois: Charles C. Thomas Publ.
- McCurdy, P.R., Kirkman, H.N., Naiman, J.I., Jim, R.T.S. & Pickard, B.M. 1966. A Chinese Variant of Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase. *J. Lab. Clin. Med.* **67**: 374-9
- Morelli, A., Benatti, U., Lenzerini, L., Sparatore, B., Salamino, F., Melloni, E., Michetti, M., Pontremoli, S. & De Flora, A. 1981. The Interference of Leukocytes and Platelets With Measurement of Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Activity of Erythrocytes With Low Activity Variants of the Enzyme. *Blood.* **58**(3):642-4
- Motulsky, A.G., Yoshida, A. 1969. Methods for the Study of Red Cell Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase. Dlm. Jorge J. Yunis (pnyt.). *Biochemical Methods in Red Cell Genetics*: 51-93. New York: Academic Press.
- Normah J., Choo, K.E., Oppenheimer, S.J., Selamah, G. 1991. Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Enzyme Activity in Normal, Hemizygote and Heterozygote Kelantanese Malays. *J. Paediatr. Child. Health* **27**:376-9
- Panich, V., Sungnate, T., Wasi, P., Na-Nakorn, S. 1972. G6PD Mahidol: The most common glucose-6-phosphate dehydrogenase variant in Thailand. *J. Med. Ass. Thailand* **55**:576-80
- Panich, V., Sungnate, T. 1973. Characterization of Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase in Thailand. *Humangenetik* **18**:39-46
- Panich, V., Na-Nakorn, S., Wasi, P. 1980. G-6-PD Variants in Chinese in Thailand. *Southeast Asian J. Trop. Med. Pub. Health* **11**(2):250-5
- Prchal, J.T., Kelly, H., 1988. Two Apparent G6PD Variants in Normal XY Males : G6PD Alabama. *Ame. J. Med.* **84**:517-23

- Robinson, M.J., Lank, K.S., Lin, H.P., Chan, G.L. 1975. Screening for G6PD Deficiency. *Med. J. Malaysia*. **30**(4):286-90
- Saha, N., Banerjee, B. 1971a. Incidence of Erythrocyte Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Deficient Among Different Ethnic Groups in India. *Human Hered.* **21**:78-82
- Saha, N., Banerjee, B. 1971b. Erythrocyte Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Deficiency among Chinese and Malays of Singapore. *Trop. Geogr. Med.* **23**:141
- Saha, N., Hong, S.H., Wong, H.A., Tay, J.S.H. 1990. Red Cell Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Phenotype in Several Mongoloid Population in Eastern India: Existence of Non-Deficient Fast Variant in Two Australasia Tribes. *Ann. Human Biology*. **17**(6):529-32
- Saha, N., Hong, S.H., Wong, H.A., Jeyaseelan, K., Tay, J.S.H. 1991. Biochemical Characteristics of Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Variants Among the Malays of Singapore with Report of a New Non-Deficient Variants (*Gd<sup>singapore</sup>*) and Three Deficient Variants. *Jpn. J. Human Genet* **36**:307-12
- Scott, MD., Lubin, B.H., Zuo, L., Kuypers, F.A. 1991. NADPH, not Glutathione Status Modulates Oxidant Sensitivity in Normal & G6PD Deficient Erythrocytes. *Blood*. **77**(9):2059-64
- Singh, H. 1986. G6PD Deficiency: A Preventable Cause of Mental Retardation. *British Med. J.* **292**:397-8
- Tang, T., Huang, C.S., Huang, M.J., Tan, K.B., Yeh, C.H., Taang, C.H.C. 1992. Important Mutations Result in Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase (G6PD) Polymorphism in Taiwan. *Blood*. **79**:2135-40
- Town, M., Athanasiou-Metaxa, M., Luzatto, L. 1990. Intragenic Interspecific Complementation of Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase in Human-Hamster Cell Hybrids. *Somatic Cell and Molecular Genetics* **16**(2): 97-108

- Trent, R.J., 1993. *Molecular Medicine: An Introduction Text for Students*. London: Churchill Living Stone.
- Vulliamy, T., Beutler, E., Luzatto, L. 1993. Variants of glucose-6-phosphate dehydrogenase are due to missense mutations spread throughout the coding region of the gene. *Hum. Mutt.* **2**:159-66
- Wang, Y.M., Patterson H.J., Van Eys, J. 1971. The potential use of xylitol in glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency anemia. *J. Clin. Invest.* **50**:1421-4
- WHO. 1967. Standardization of procedure for the study of Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase. *World Health Organization Technical Report Series*. Geneva No.366
- WHO. 1985. Report of a WHO Working Group: Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Deficiency. *WHO / HDP / WG / G6PD / 85-9*. Geneva: 1 - 71
- WHO Working Group. 1989 Update/Le Point : Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Deficiency. *Bulletin of the world Health Organization* **67**(60):601-11
- Wilkinson, J.H. 1976. *The Principles & Practices of Diagnostic Enzymology*. London: Edward Arnold Publ.
- Wong, H.B., 1975. A Surveillance System to Prevent Kernicterus in Singapore Infants. *Singapore Pad. Society J.* **17**(1):1-9
- Yoshida, A., Baur, E.W., Moutlsky, A.G. 1970. A Philippino Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Variant (G6PD Union) with Enzyme Deficiency and Altered Substrate Specificity. *Blood* **35**(4):506-13