

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

A. Telaah Pustaka

1. Diabetes Melitus

a. Pengertian Diabetes Melitus

Diabetes melitus (DM) merupakan suatu kelompok penyakit gangguan metabolik yang ditandai dengan hiperglikemia (kadar glukosa darah yang tinggi) yang disebabkan oleh gangguan sekresi insulin, kerja insulin, atau keduanya (Perkeni, 2021). Normalnya hormon insulin dihasilkan oleh sel beta pankreas untuk mengatur banyaknya gula dalam darah (Wahyuni, 2020). DM merupakan penyakit menahun (kronis) berupa gangguan metabolik yang ditandai dengan peningkatan kadar gula darah yang melebihi batas normal (Kemenkes, 2021).

b. Klasifikasi Diabetes Melitus

DM berdasarkan penyebabnya, menurut *American Diabetes Association* (2018), diklasifikasikan menjadi 5 macam, yaitu:

1) Diabetes Melitus Tipe 1 (DM Tipe 1):

Diabetes tipe 1 adalah kondisi autoimun dimana sistem kekebalan tubuh menghancurkan sel beta pankreas yang memproduksi insulin. Ini biasanya dimulai pada usia muda dan memerlukan terapi insulin seumur hidup, namun bisa juga terjadi pada usia dewasa.

Ciri-ciri: Biasanya muncul pada usia kanak-kanak atau remaja.

2) Diabetes Melitus Tipe 2 (DM Tipe 2):

Diabetes tipe 2 ditandai dengan resistensi insulin dan/atau penurunan produksi insulin. Ini lebih sering terjadi pada orang dewasa dan sering dikaitkan dengan obesitas dan gaya hidup.

Ciri-ciri: Biasanya muncul pada usia dewasa, tetapi semakin sering ditemukan pada anak dan remaja. Penanganannya dapat melibatkan perubahan gaya hidup, obat oral, dan kadang-kadang insulin.

3) Diabetes Melitus Gestasional (DM Gestasional):

Diabetes yang terjadi selama kehamilan dan biasanya hilang setelah melahirkan. Namun, wanita yang mengalaminya berisiko lebih tinggi untuk mengembangkan diabetes tipe 2 di kemudian hari.

Ciri-ciri: Didiagnosis selama kehamilan dan biasanya disembuhkan setelah persalinan, tetapi memerlukan pemantauan dan penanganan selama kehamilan.

4) Diabetes Melitus Lainnya (Diabetes Sekunder):

Diabetes yang disebabkan oleh kondisi medis lain atau penggunaan obat tertentu, seperti pankreatitis kronis, sindrom *Cushing*, atau penggunaan obat steroid jangka panjang.

Ciri-ciri: Penyebab diabetes ini adalah kondisi medis sekunder atau terapi obat, dan penanganannya sering melibatkan pengelolaan kondisi yang mendasari.

5) Diabetes Melitus Monogenik:

Diabetes yang disebabkan oleh mutasi pada satu gen, seperti Diabetes Neonatal/*Diabetes Maturity Onset Diabetes of the Young* (MODY). Merupakan bentuk diabetes yang jarang dan biasanya memerlukan penanganan khusus berdasarkan jenis mutasi genetik yang mendasarinya.

c. **Diagnosis Diabetes Melitus**

Penderita DM secara garis besar tidak mampu memproduksi hormon insulin dalam jumlah cukup atau tubuh tidak bisa menggunakannya secara efektif sehingga terjadi kelebihan gula di dalam darah. Kelebihan gula yang kronis dalam darah (hiperglikemia) ini justru menjadi racun bagi tubuh (Irianto, 2016). Hiperglikemia menyebabkan penempelan non-enzimatik glukosa pada berbagai protein (glikasi), proses ini *irreversible* pada kondisi fisiologis dan karenanya kondisi protein terglikasi merupakan cerminan kadar glukosa darah rata-rata selama waktu hidup protein tersebut (Shepherd dkk., 2014).

Diagnosis DM ditegakkan atas dasar pemeriksaan kadar glukosa darah dan HbA1c. Pemeriksaan glukosa darah yang dianjurkan adalah pemeriksaan glukosa secara enzimatik dengan bahan plasma darah vena. Pemantauan hasil pengobatan dapat dilakukan dengan glukometer. Diagnosis tidak dapat ditegakkan atas dasar adanya glukosuria. Kecurigaan adanya DM juga perlu dilihat dari berbagai keluhan dapat ditemukan pada pasien DM (Perkeni, 2021).

Kriteria diagnosis diabetes melitus berdasarkan konsensus pengelolaan dan pencegahan diabetes melitus di Indonesia oleh Perkeni (2021) ditunjukkan pada tabel berikut:

Tabel 1. Kriteria Diagnosis Diabetes Melitus

Pemeriksaan glukosa plasma puasa ≥ 126 mg/dL. Puasa adalah kondisi tidak ada asupan kalori minimal 8 jam.
Atau
Pemeriksaan glukosa plasma ≥ 200 mg/dL 2-jam setelah Tes Toleransi Glukosa Oral (TTGO) dengan beban glukosa 75 gram.
Atau
Pemeriksaan glukosa plasma sewaktu ≥ 200 mg/dL dengan keluhan klasik atau krisis hiperglikemia.
Atau
Pemeriksaan HbA1c 6,5% dengan menggunakan metode yang terstandarisasi oleh <i>National Glycohaemoglobin Standardization Program</i> (NGSP) dan <i>Diabetes Control and Complications Trial assay</i> (DCCT).

Sumber: Perkeni, 2021

Hasil pemeriksaan yang tidak memenuhi kriteria normal atau diabetes melitus dikategorikan sebagai prediabetes, yang mencakup beberapa pemeriksaan dengan rentang hasil sebagai berikut:

Tabel 2. Kadar Tes Laboratorium Darah untuk Diagnosis Diabetes dan Prediabetes

Klasifikasi	HbA1c (%)	Glukosa darah puasa (mg/dL)	Glukosa plasma 2 jam setelah TTGO (mg/dL)
Diabetes	$\geq 6,5$	≥ 126	≥ 200
Prediabetes	5,7 – 6,4	100 – 125	140 – 199
Normal	$< 5,7$	70-99	70-139

Sumber: Perkeni, 2021

Pengukuran hemoglobin A1c (HbA1c) direkomendasikan sebagai *gold standard* dalam diagnosis diabetes dan pemantauan gula darah jangka panjang pada pasien diabetes karena hasil dari gula darah puasa saja tidak dapat memberikan informasi yang akurat mengenai gambaran sebenarnya variabilitas gula darah pada pasien diabetes melitus (Hasanah & Ikawati, 2021). HbA1c kini direkomendasikan sebagai standar perawatan (*standard of care/SOC*) untuk pengujian dan pemantauan diabetes, khususnya diabetes melitus tipe 2 (WHO, 2011).

Tabel 3. Kadar HbA1c Sebagai Indikator Pengendalian Diabetes

GULA DARAH		STATUS	HbA1c	
mmol/L	mg/dL		%	mmol/mol
5,4	97	Normal	5	31
7,0	126		6	42
8,6	155	Pre-diabetes	7	53
10,2	184	Diabetes I	8	64
11,8	212	Diabetes II	9	75
13,4	241		10	86
14,9	268	Diabetes III	11	97
16,5	297		12	108

Sumber: Sherwani dkk., 2016

2. Hemoglobin A1c (HbA1c)

a. Sejarah dan Pengertian HbA1c

Secara historis, HbA1c pertama kali diisolasi oleh Huisman dkk pada tahun 1958 dan dikarakterisasi oleh Bookchin dan Gallop pada tahun 1968, sebagai glikoprotein. Peningkatan kadar HbA1c pada pasien diabetes dilaporkan oleh Rahbar dkk pada tahun 1969. Bunn dkk

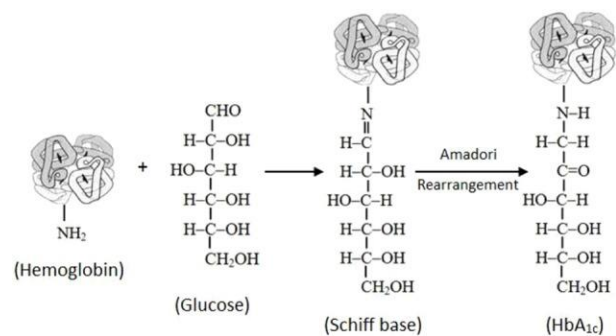
mengidentifikasi jalur menuju pembentukan HbA1c pada tahun 1975. Penggunaan HbA1c sebagai biomarker untuk memantau kadar glukosa di antara pasien diabetes pertama kali diusulkan oleh Koenig dkk pada tahun 1976 (Sherwani dkk., 2016).

Hemoglobin terlikasi adalah bentuk hemoglobin yang diukur terutama untuk mengidentifikasi konsentrasi glukosa plasma rata-rata selama periode yang lama. HbA1c dibentuk dalam jalur glikasi non-enzimatik oleh paparan hemoglobin terhadap glukosa plasma (Riyana, 2019). HbA1c adalah istilah yang diterima secara internasional untuk GHb. Namun, istilah *glycosylated hemoglobin* atau dalam istilah laboratorium modern disebut *glycated haemoglobin* (GHb) tidak digunakan secara umum. Istilah tersebut kini dikenal sebagai hemoglobin A1c (HbA1c) (Sacks dkk., 2014).

b. Biokimia HbA1c

HbA1c adalah bentuk hemoglobin A (HbA) yang terikat dengan glukosa. Hemoglobin sendiri terdiri dari empat subunit: dua subunit alfa (α) dan dua subunit beta (β), masing-masing dengan struktur globin dan grup heme yang mengikat oksigen. Hemoglobin A1c (HbA1c) adalah bentuk hemoglobin yang terikat pada glukosa melalui ikatan glikosilasi. Dalam HbA1c, glukosa berikatan dengan lisin (residu asam amino) pada rantai β hemoglobin. Ikatan ini merupakan ikatan non-enzimatik antara yang terjadi tanpa bantuan enzim, berbeda dari glikosilasi yang biasanya terjadi pada reaksi-reaksi yang dikatalisis oleh enzim (Nelson, 2012).

Protein sering kali terglykasi selama berbagai reaksi enzimatik ketika kondisi fisiologisnya menguntungkan. Namun, dalam hemoglobin, glykasi terjadi melalui reaksi nonenzimatik antara glukosa dan ujung N-terminal rantai β , yang membentuk *schiff base*. Selama penataan ulang, *schiff base* diubah menjadi produk Amadori, yang paling terkenal adalah HbA1c. Proses utama pembentukan hemoglobin terglykasi dimulai dengan interaksi reversibel antara hemoglobin dan glukosa darah untuk membentuk aldimin. Pada tahap sekunder, aldimin berubah secara ireversibel menjadi ketoamine yang stabil (Sherwani dkk., 2016).



Gambar 1. Pembentukan hemoglobin terglykasi (HbA1c)

Proses pembentukan HbA1c adalah sebagai berikut:

- 1) **Rantai Beta:** Glukosa berikatan dengan residu lisin pada rantai beta hemoglobin. Spesifiknya, glukosa terikat pada posisi N-terminal lisin pada rantai beta. Hemoglobin A memiliki dua rantai beta.
- 2) **Ikatan Glikosilasi:** Ikatan antara glukosa dan lisin adalah ikatan amina. Ini adalah proses glikosilasi non-enzimatik yang menghasilkan HbA1c. Glikosilasi ini tidak mengubah struktur utama hemoglobin yang mengikat oksigen, tetapi mempengaruhi proporsi hemoglobin yang terikat dengan glukosa dalam darah.

- 3) **Jenis Ikatan:** Ikatan antara glukosa dan lisin adalah ikatan amina (berupa *base Schiff* dan produk akhir dari reaksi *Maillard*), yang terbentuk ketika kelompok karbonil dari glukosa bereaksi dengan kelompok amina dari lisin.
- 4) **Proses Pembentukan:** pada reaksi awal glukosa bereaksi dengan kelompok amina dari lisin, menghasilkan *base schiff* (produk intermediat yang tidak stabil). Kemudian *base schiff* mengalami *rearrangement* menjadi produk akhir stabil, yaitu HbA1c, yang merupakan bentuk glikosilasi hemoglobin yang lebih stabil.
- 5) **Produk Akhir:** Produk Amadori, dalam konteks hemoglobin, adalah HbA1c. Dalam hemoglobin, glukosa terikat secara stabil pada lisin di rantai beta hemoglobin. Hemoglobin yang terikat glukosa ini tetap dalam bentuk HbA1c sepanjang masa hidup sel darah merah, yaitu sekitar 120 hari (Sherwani dkk., 2016).

Hemoglobin dewasa normal sebagian besar terdiri dari HbA ($\alpha_2\beta_2$), HbA2 ($\alpha_2\delta_2$), dan HbF ($\alpha_2\gamma_2$) dengan komposisi masing-masing sebesar 97%, 2,5%, dan 0,5%. Sekitar 6% dari total HbA disebut HbA1, yang terdiri dari fraksi HbA1a1, HbA1a2, HbA1b, dan HbA1c yang ditentukan oleh sifat elektroforesis dan kromatografinya. Komponen tersebut ditemukan pertama kali oleh Allen, Schroeder dan Balog yang memisahkannya melalui kromatografi pada resin pertukaran kation dan disebut sebagai hemoglobin A1a, A1b dan A1c sesuai dengan elusinya (Sherwani dkk., 2016).

HbA1c merupakan fraksi yang paling melimpah dan di bidang kesehatan mencakup sekitar 5% dari total fraksi HbA. Seperti disebutkan di atas, glukosa dalam format rantai terbuka berikatan dengan terminal-N untuk membentuk aldimin sebelum mengalami penataan ulang Amadori untuk membentuk ketoamine yang lebih stabil. Ini adalah proses nonenzimatik yang terjadi terus menerus secara *in-vivo*. Pembentukan hemoglobin terglukasi merupakan bagian normal dari siklus fungsi fisiologis. Namun, seiring dengan peningkatan rata-rata glukosa plasma, jumlah hemoglobin terglukasi dalam plasma juga meningkat (Sherwani dkk., 2016).

c. HbA1c dalam Pemeriksaan DM

Analisis HbA1c atau Hemoglobin A1c, adalah tes darah yang digunakan untuk memantau kontrol glikemik pada individu dengan diabetes. HbA1c mengukur persentase hemoglobin yang telah berikatan dengan glukosa dalam darah. Ini memberikan gambaran tentang kadar glukosa darah rata-rata selama 90-120 hari atau 3-4 bulan terakhir. Kandungan HbA1c dalam darah mencerminkan kadar glukosa darah rata-rata selama beberapa bulan terakhir, karena hemoglobin memiliki umur sekitar 120 hari. Ikatan ini adalah alasan utama mengapa HbA1c digunakan sebagai indikator jangka panjang dalam pengelolaan diabetes, karena tingkat HbA1c berkorelasi dengan kadar glukosa darah rata-rata selama periode waktu tersebut (Makris & Spanou, 2011).

Tabel 4. Perbedaan Pemeriksaan Glukosa dan HbA1c

Parameter	Pemeriksaan Glukosa	Pemeriksaan HbA1c
Pengolahan Darah	Mebutuhkan pengolahan darah dengan cepat, pemisahan dan penyimpanan plasma minimal pada suhu 4°C.	Menghindari kondisi lebih dari 12 jam pada temperatur suhu > 23°C. Jika tidak simpan pada suhu 4°C (stabilitas minimal 1 minggu).
Pengukuran	Tersedia luas	Belum tersedia luas
Biaya	Terjangkau	Tidak Terjangkau
Persiapan Pasien Sebelum Pengambilan Sampel Darah	Persyaratan persiapan pasien yang ketat dibutuhkan dengan tujuan diagnostik.	Tidak ada persiapan khusus.
Standarisasi	Standar untuk prosedur metode referensi.	Standar untuk prosedur metode referensi.
Kalibrasi Rutin	Kalibrasi Rutin	Kalibrasi Rutin
Interferensi: Penyakit	Beberapa penyakit dapat meningkatkan konsentrasi glukosa.	Beberapa penyakit dapat memperpendek waktu hidup eritrosit dan memberikan kesan kadar HbA1c yang menurun.
Haemoglobinopati	Sedikit berpengaruh apabila pasien sakit.	Dapat berpengaruh dalam beberapa pengukuran.
Sifat Haemoglobinopati	Tidak berpengaruh.	Sebagian besar tidak berpengaruh.
Gambaran Hasil	Memberi gambaran kadar glukosa pada saat itu saja	Memberi gambaran kadar glukosa selama 3 bulan/8-12 minggu terakhir

Sumber: WHO, 2011

Kadar HbA1c dapat menjadi penanda spesifik untuk komplikasi diabetes seperti penyakit kardiovaskular, nefropati, dan retinopati akibat kemampuannya dalam memantau glukosa darah dalam beberapa bulan terakhir. Keuntungan dari pemeriksaan HbA1c adalah pasien tidak perlu dipuasakan. HbA1c juga lebih stabil dalam darah dibandingkan glukosa darah sehingga tidak berpengaruh saat perpindahan sampel ke laboratorium dibandingkan dengan tes glukosa (WHO, 2011).

3. Pemeriksaan Laboratorium HbA1c

a. Metode Pemeriksaan HbA1c

Metode analisis HbA1c secara umum dapat dibagi menjadi dua kategori: metode berdasarkan perbedaan muatan (Kromatografi penukar ion dan elektroforesis kapiler) dan metode berdasarkan perbedaan struktural (*immunoassay*, uji enzimatis, dan kromatografi afinitas). Dengan demikian, penentuan rutin HbA1c dapat dicapai dengan metode berdasarkan prinsip yang berbeda setiap metodenya. Setidaknya ada 30 metode laboratorium berbeda yang tersedia secara komersial untuk mengukur proporsi HbA1c dalam darah (Sherwani dkk., 2016).

NSGP/*National Glycohemoglobin Standardization Program* (2024) mengeluarkan daftar metode dan alat yang sudah terstandarisasi untuk pemeriksaan HbA1c dalam "*List of NGSP Certified Methods*" yang selalu di perbaharui setiap bulannya. Beberapa jenis metode pemeriksaan HbA1c beserta dengan pengertiannya, sebagai berikut:

- 1) **HPLC (*High-Performance Liquid Chromatography*)**: Ini adalah metode standar emas untuk mengukur HbA1c. HPLC memisahkan berbagai bentuk hemoglobin dan mengukur persentase HbA1c dalam sampel darah.
- 2) ***Immunoassay***: Metode ini menggunakan antibodi yang spesifik untuk HbA1c untuk mendeteksi dan mengukur kadar HbA1c dalam darah. Ada beberapa jenis *immunoassay* contohnya *imunohistokimia* dan *imunofluoresensi* yang cukup sering digunakan.
- 3) ***Electrophoresis***: Metode ini memisahkan hemoglobin berdasarkan muatan listriknya dan dapat digunakan untuk mengukur HbA1c. Metode ini jarang digunakan dibandingkan HPLC.
- 4) ***Point-of-Care Devices***: Beberapa perangkat portabel atau sistem tes rumah yang dapat digunakan untuk mengukur HbA1c. Perangkat ini sering digunakan untuk pemantauan rutin dan lebih mudah digunakan oleh pasien di rumah, meskipun akurasinya bisa bervariasi tergantung pada perangkatnya.
- 5) ***Capillary Blood Testing***: Ini melibatkan pengambilan sampel darah dari ujung jari dan dapat digunakan dengan beberapa perangkat *point-of-care* untuk mengukur HbA1c secara langsung.
- 6) ***Direct Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)***: Ini adalah metode berbasis enzim yang digunakan untuk mendeteksi kadar HbA1c. ELISA mengandalkan antigen-antibodi untuk mengukur kadar HbA1c dan dapat memberikan hasil yang cukup akurat.

Berikut ini merupakan keunggulan dan kelemahan dari metode HPLC yang menjadi *gold standard* dan metode *Immunoassay* yang banyak digunakan oleh laboratorium saat ini dalam pemeriksaan HbA1c.

Keunggulan metode HPLC:

- 1) Akurasi Tinggi: metode ini dapat memisahkan berbagai jenis hemoglobin dan mengukur persentase HbA1c dengan ketepatan tinggi.
- 2) Konsistensi dan Reprodusibilitas: Metode ini memberikan hasil yang konsisten dan dapat direproduksi di berbagai laboratorium, sehingga memudahkan perbandingan hasil antara laboratorium berbeda.
- 3) Kemampuan Deteksi: HPLC dapat mendeteksi berbagai bentuk hemoglobin yang mungkin ada dalam sampel darah, termasuk variasi yang jarang terjadi, seperti hemoglobin variant yang dapat mempengaruhi pengukuran.
- 4) Standar Emas: Banyak pedoman klinis dan standar internasional menganggap HPLC sebagai metode referensi, menjadikannya metode yang dapat diandalkan untuk diagnosis dan manajemen diabetes.

Kelemahan metode HPLC:

- 1) Biaya Tinggi: Peralatan HPLC cenderung mahal dan memerlukan biaya pemeliharaan yang signifikan. Ini bisa menjadi kendala di laboratorium dengan anggaran terbatas.
- 2) Kompleksitas: Metode ini memerlukan keterampilan teknis dan pelatihan untuk operator, serta pemeliharaan rutin agar tetap berfungsi dengan baik.

- 3) Waktu Pengujian: Proses pengujian dengan HPLC dapat memakan waktu lebih lama dibandingkan dengan beberapa metode lain, yang dapat mempengaruhi kecepatan hasil.

Keunggulan metode *Immunoassay*:

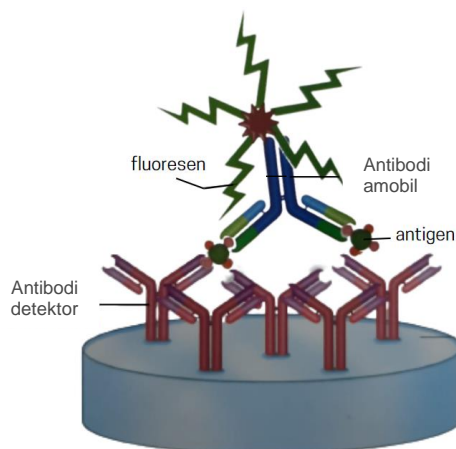
- 1) Kemudahan dan Kecepatan: *Immunoassay*, Prosedur *immunoassay* umumnya lebih sederhana dan lebih cepat dibandingkan dengan metode seperti HPLC, memungkinkan hasil yang lebih cepat.
- 2) Biaya Lebih Rendah: Umumnya, alat dan bahan untuk *immunoassay* lebih terjangkau dibandingkan dengan HPLC, sehingga dapat menjadi pilihan yang lebih ekonomis.
- 3) Kemudahan Penggunaan: Banyak sistem *immunoassay* yang dirancang dengan lebih sederhana, sehingga memudahkan dalam pengoperasian.
- 4) Volume Sampel Kecil: *Immunoassay* memerlukan volume sampel darah yang kecil, yang membuatnya lebih nyaman untuk pasien.
- 5) Presisi dan Akurasi: Meskipun HPLC sering dianggap sebagai standar emas, metode *immunoassay* juga menawarkan tingkat presisi dan akurasi yang tinggi untuk pengukuran HbA1c.
- 6) Interferensi yang Minimal: Metode *immunoassay* biasanya dirancang untuk meminimalkan interferensi dari komponen darah lain, yang dapat meningkatkan akurasi hasil.
- 7) Pemantauan Rutin: Untuk pemantauan HbA1c di rumah atau klinik, *immunoassay* bisa sangat berguna karena kemudahan dan waktu analisis yang cepat dan mudah.

Kelemahan metode *Immunoassay*:

- 1) Keterbatasan Sensitivitas: Dalam beberapa kasus, *immunoassay* mungkin kurang sensitif dibandingkan dengan HPLC.
- 2) Akurasi yang Bervariasi: Walaupun akurat, *immunoassay* dapat menunjukkan hasil yang kurang tepat dibandingkan HPLC, terutama jika ada interferensi dari komponen lain dalam sampel darah.
- 3) Variabilitas Metode: Ada berbagai jenis *immunoassay* dengan teknologi yang bervariasi, yang dapat menyebabkan perbedaan dalam hasil jika tidak menggunakan perangkat yang telah divalidasi dengan baik.
- 4) Keterbatasan pada Penderita Anemia: Pada pasien dengan anemia atau kondisi yang mempengaruhi masa hidup sel darah merah, hasil *immunoassay* mungkin kurang akurat karena adanya perubahan dalam distribusi hemoglobin yang tidak terukur dengan baik oleh metode ini.
- 5) Perlu Kalibrasi dan Kontrol Kualitas: Untuk menjaga akurasi, sistem *immunoassay* perlu kalibrasi dan kontrol kualitas yang tepat.

Metode pengukuran kadar HbA1c yang digunakan dapat berbeda di setiap laboratorium klinik. Namun dari metode-metode pemeriksaan yang ada, metode *immunoassay* adalah salah satu yang banyak digunakan karena dapat dikerjakan dengan jumlah sampel yang banyak dan relative cepat. Berdasarkan hasil survei pendahuluan banyak laboratorium yang menggunakan metode *Flourescence Immunoassay* (FIA) untuk penentuan kuantitatif HbA1c dalam darah lengkap manusia menggunakan instrumen IChroma™ (Boditech, 2021).

b. Prinsip Pemeriksaan HbA1c metode FIA



Gambar 2. Reaksi *Sandwich Immunodetection*

Tes ini menggunakan metode *sandwich immunodetection*; antibodi detektor dalam buffer mengikat antigen dalam sampel, membentuk kompleks antigen-antibodi, dan bermigrasi ke matriks nitroselulosa untuk ditangkap oleh antibodi amobil lainnya pada strip tes.

Lebih banyak antigen dalam sampel akan membentuk lebih banyak kompleks antigen-antibodi yang mengarah pada sinyal fluoresensi yang lebih kuat oleh antibodi detektor, yang diproses oleh instrumen untuk tes ichroma untuk menunjukkan kandungan hemoglobin terglikasi dalam persen dari total hemoglobin dalam darah (Boditech, 2021).

Sampel darah ditambahkan ke dalam wadah yang mengandung antibodi spesifik pertama yang akan mengikat HbA1c. Antibodi ini disebut "antibodi kaptur" karena fungsinya adalah menangkap dan mengikat HbA1c yang ada dalam sampel. Setelah antibodi kaptur terikat dengan antigen (HbA1c), sampel ditambahkan ke dalam wadah. Antibodi kaptur yang sudah ada di wadah akan mengikat HbA1c.

Setelah HbA1c terikat dengan antibodi kaptur, antibodi deteksi yang telah dilabeli dengan fluorokrom (zat fluoresen) ditambahkan. Antibodi deteksi ini akan berikatan dengan HbA1c yang terikat pada antibodi kaptur, membentuk kompleks *sandwich*: antibodi kaptur-HbA1c-antibodi deteksi. Setelah inkubasi, sistem dicuci untuk menghilangkan antibodi deteksi yang tidak terikat dan mengurangi kemungkinan sinyal latar belakang. Setelah antibodi deteksi terikat pada kompleks, reaksi yang terjadi pada antibodi deteksi, seperti perubahan warna atau fluoresensi, kemudian diukur. Intensitas sinyal ini berkorelasi dengan jumlah HbA1c dalam sampel (Darwish, 2006).

Cara deteksi fluoresensi yaitu fluoresensi dari fluorokrom yang terikat pada antibodi deteksi diukur menggunakan spektrofluorometer atau alat deteksi fluoresensi khusus. Ketika fluorokrom terkena cahaya dengan panjang gelombang tertentu, ia akan memancarkan cahaya pada panjang gelombang berbeda. Intensitas cahaya fluoresen yang dipancarkan berbanding lurus dengan jumlah HbA1c dalam sampel. Intensitas fluoresensi yang terukur kemudian dianalisis untuk menentukan konsentrasi HbA1c dalam sampel. Biasanya, semakin tinggi intensitas fluoresensi, semakin tinggi konsentrasi HbA1c (Darwish, 2006).

c. Sampel Pemeriksaan HbA1c

Sampel yang digunakan dalam pemeriksaan HbA1c ini adalah sampel darah *whole blood*. Darah merupakan jaringan dalam tubuh yang berbentuk cair berwarna merah. *Whole blood* adalah produk darah yang komponen di dalamnya masih lengkap mengandung eritrosit, leukosit, trombosit dan plasma (Kiswari, 2014). Sampel yang digunakan pada tes HbA1c adalah *Whole blood* dari pembuluh darah kapiler maupun vena dengan antikoagulan (Jeppsson dkk., 2014). Untuk mendapatkan sampel ini, darah diambil langsung dari pasien kemudian dimasukkan ke dalam tabung darah yang sudah berisi antikoagulan. Komponen darah yang akan digunakan dalam pemeriksaan HbA1c ini yaitu hemoglobin (Kiswari, 2014). *Whole blood* yang disimpan di refrigerator pada suhu 2-6°C tetap mampu mengoksidasi jaringan selama 3-5 minggu, tergantung pada larutan pengawet yang digunakan (Freise dkk., 2015).

Antikoagulan merupakan suatu zat yang ditambahkan ke dalam darah untuk menghambat atau mencegah proses pembentukan bekuan darah dengan cara mengikat atau mengendapkan ion kalsium dan menghambat pembentukan trombin dari protombin. Dengan pemberian antikoagulan pada darah, didapat sampel darah utuh atau didapatkan plasma yang diperoleh dari hasil sentrifugasi (Nugraha, 2017).

Dalam pemeriksaan HbA1c menggunakan IChroma ini sampel harus menggunakan antikoagulan yang direkomendasikan alat, yaitu: K₂EDTA, K₃EDTA, NaEDTA, Lithium heparin, Sodium sitrat

(Boditech, 2021). Ada beberapa jenis EDTA namun jenis EDTA yang direkomendasikan oleh *World Health Organization* (WHO), *International Council for Standardization in Hematology* (ICSH) dan *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) untuk pemeriksaan hematologi adalah tabung vacutainer adalah K₂EDTA.

Larutan ini EDTA digunakan untuk mencegah pembekuan darah, di mana 1 mg EDTA dapat mencegah pembekuan dalam 1 ml darah dan biasanya digunakan dalam bentuk kering (serbuk). EDTA juga bisa digunakan dalam bentuk larutan dengan perbandingan 0,1 ml untuk 1 ml darah, meskipun ini dapat mengencerkan darah. Konsentrasi K₂EDTA yang direkomendasikan oleh BD *Vacutainer Company* adalah 1,8 mg/mL, sehingga terdapat 5,4 mg K₂EDTA dalam tabung vacutainer berukuran 3 ml (Becton, 2014).

Untuk pemeriksaan HbA_{1c}, sampel yang dapat digunakan adalah darah vena atau kapiler. Darah vena yang dimasukkan dalam tabung antikoagulan dapat disimpan untuk beberapa saat, sedangkan sampel kapiler harus segera diperiksa (Boditech, 2021).

d. Waktu Simpan *Whole Blood*

Pemeriksaan laboratorium dengan memakai darah EDTA lebih baik dilakukan dengan segera, atau jika tidak disimpan dalam lemari es (4°C). Darah EDTA yang disimpan pada 4°C selama 24 jam memberikan nilai hematokrit yang lebih tinggi. Pada darah EDTA dapat disimpan 24 jam di dalam lemari es tanpa mendatangkan penyimpangan

yang bermakna, kecuali untuk jumlah trombosit dan nilai hematokrit (Gandasoebrata, 2016). Pada sampel darah EDTA, sebaiknya pemeriksaan dilakukan selambatnya 2 jam pada suhu kamar, namun pada sampel darah dengan antikoagulan tersebut dapat disimpan selama 10 hari pada suhu 2 - 8°C dan masih bisa digunakan untuk beberapa parameter pemeriksaan (Waluyo dkk., 2019).

Data dari survei pendahuluan yang telah dilakukan kepada 43 laboratorium (35 Rumah Sakit dan 8 Laboratorium Klinik) di daerah Jawa Barat dan Jabodetabek didapatkan data bahwa kebijakan penyimpanan spesimen *whole blood* sebelum pemusnahan dengan penyimpanan selama 30 hari (4,65%), 14 hari (2,33%), 7 hari (27,91%), 4 hari (9,30%), 3 hari (27,91%), 2 hari (9,30%), dan 1 hari atau langsung dibuang (18,6%). Sampai saat ini terdapat 72% laboratorium yang masih melakukan penundaan pemeriksaan HbA1c (melebihi *Turn Around Time/TAT* yang ditetapkan) dengan presentase jarang dilakukan (62,8%), cukup sering dilakukan (20,9%), dan tidak pernah melakukan penundaan (16,3%) untuk pemeriksaan HbA1c.

Penundaan pemeriksaan untuk HbA1c ini dilatar belakangi dengan berbagai alasan diantaranya dikarenakan adanya penambahan pemeriksaan (32,6%), kerusakan alat (32,6%), kehabisan stok reagen/kit pemeriksaan (25,6%), waktu pengiriman atau merujuk spesimen (23,2%), sebagai telurur ulang jika dokter meminta (11,6%), kerusakan sistem informasi laboratorium/SIL (9,3%), pergantian *shift* (7%), dan

alasan lainnya (11,6%). Alasan khusus untuk penundaan yaitu spesimen yang harus diperiksa keesokan harinya (18,9%) karena di beberapa tempat hanya melakukan pemeriksaan pada waktu tertentu (2 kali seminggu). Hal ini terjadi karena jumlah permintaan rendah dan *maintenance* alat yang sulit juga mahal.

e. Pengaruh Waktu Simpan *Whole Blood*

Penyimpanan spesimen *whole blood* untuk pengukuran HbA1c memang sangat penting untuk memastikan hasil yang akurat. Berikut adalah rincian konsekuensi dari penyimpanan sampel darah sebelum pemeriksaan HbA1c, diantaranya:

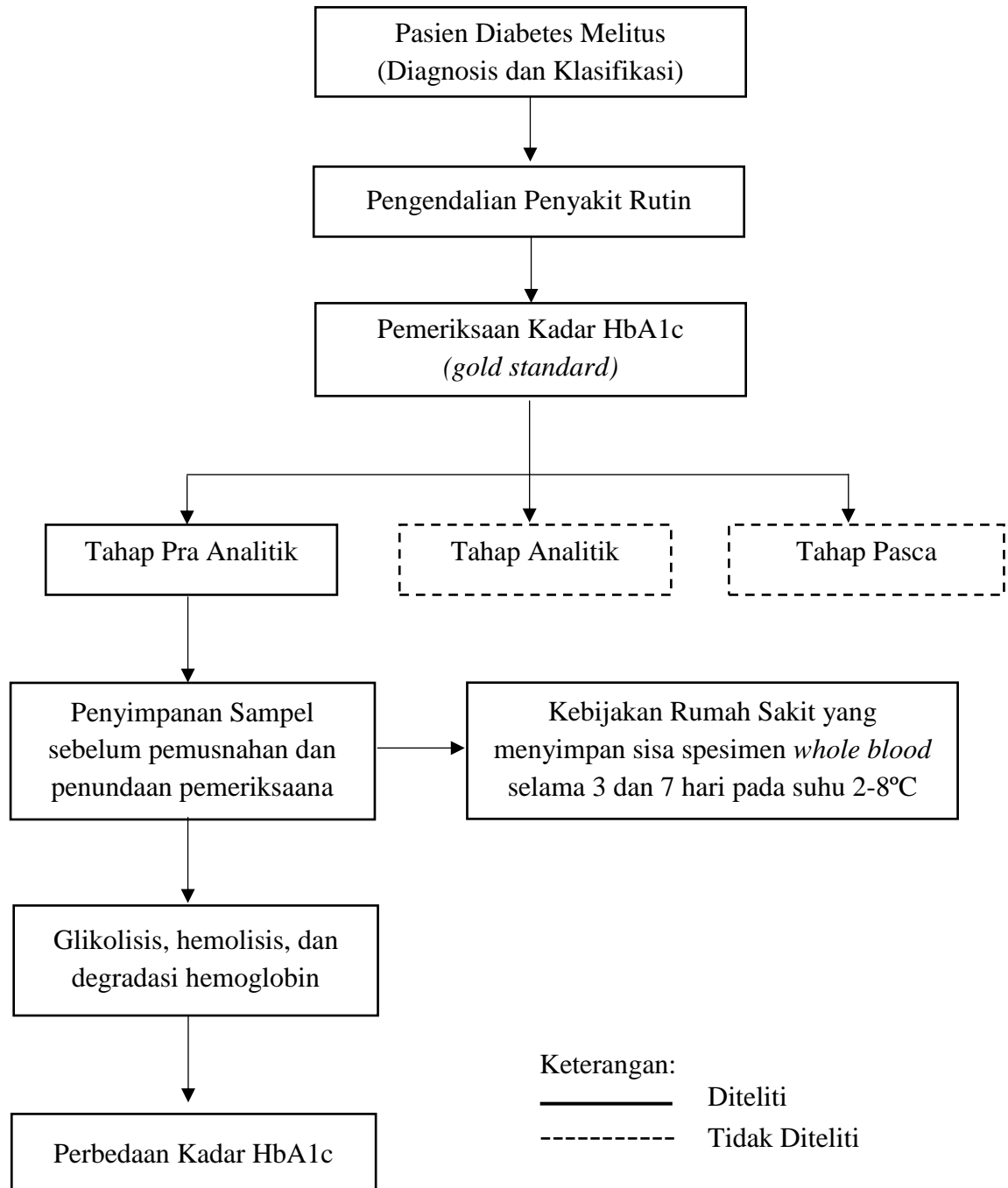
- 1) **Glikolisis:** Proses glikolisis dapat menurunkan kadar glukosa dalam sampel darah dan itu dapat mempengaruhi hasil HbA1c. Penurunan kadar glukosa ini dapat menyebabkan penurunan pada level HbA1c yang diukur, mengakibatkan hasil yang tidak mencerminkan kadar glukosa rata-rata yang sebenarnya (Glick dkk., 2003). Hal ini disebabkan karena adanya ikatan yang belum stabil antara hemoglobin dan glukosa. Keluaran produksi dari produk-produk glikasi pada awalnya bersifat akut dan reversibel yang dipengaruhi oleh hiperglikemia. Produk glikasi tersebut dibentuk di intraselular dan ekstraselular membentuk suatu gugus kombinasi glukosa dan asam amino. Gugus ini merupakan hasil reaksi non enzimatis, yang membentuk gugus "*schiff base adduct*". Produk *Schiff base adduct* ini akan mengalami perubahan struktural yang lambat menjadi bentuk

yang lebih stabil, yang dikenal sebagai produk glikasi akhir atau *Advanced Glycation End-products* (AGEs). Proses ini dapat memakan waktu beberapa minggu (Bhat dkk., 2017). Oleh karena itu, penting untuk mendinginkan sampel dan menjaga suhu penyimpanan untuk menghambat glikolisis (Glick dkk., 2003).

- 2) **Hemolisis:** Perubahan kimia pada sampel dapat terjadi selama penyimpanan yang lama. Hemolisis (pecahnya sel darah merah) dapat meningkatkan kadar HbA1c secara artifisial atau menyebabkan hasil yang tidak akurat. Hemolisis dapat mengganggu akurasi pengukuran HbA1c, baik dengan mengubah konsentrasi hemoglobin atau dengan melepaskan enzim yang bisa mempengaruhi hasil tes. Untuk mencegah ini, sampel harus disimpan dengan hati-hati dan menghindari kondisi yang dapat menyebabkan hemolisis (Sacks dkk., 2011).
- 3) **Degradasi Hemoglobin:** Hemoglobin dalam sampel dapat mengalami degradasi atau perubahan seiring waktu, terutama jika sampel disimpan dalam kondisi yang tidak ideal dan ini dapat mempengaruhi pengukuran HbA1c. Hemoglobin yang terdegradasi mungkin tidak dapat berikatan dengan glukosa dengan cara yang sama seperti hemoglobin yang utuh, yang dapat mempengaruhi hasil tes. Untuk mengurangi risiko ini, penting untuk menyimpan sampel dalam kondisi yang stabil dan sesuai (Bunn dkk., 1978).

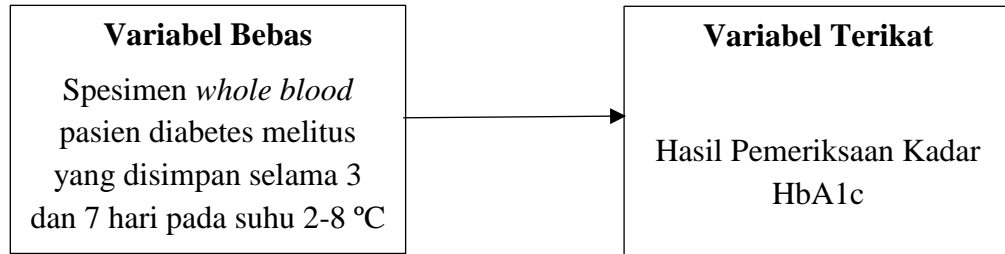
- 4) Kontaminasi Mikroba:** Kontaminasi mikroba dapat mempengaruhi komposisi dan kestabilan sampel darah. Sampel harus disimpan dalam kondisi steril dan dalam tabung yang sesuai untuk menghindari pertumbuhan mikroba yang dapat mengganggu hasil tes. Mikroba ini dapat mempengaruhi komponen darah dan menyebabkan perubahan pada hasil tes HbA1c (Baker dkk., 2004). Namun, hal ini bisa dikontrol dengan menggunakan tempat dan alat-alat yang steril agar tidak terjadi kontaminasi mikroba.
- 5) Ketidakstabilan Suhu:** Penyimpanan pada suhu ruangan atau suhu yang tidak tepat dan stabil dapat mempengaruhi struktur hemoglobin dan hasil HbA1c. Hemoglobin dapat mengalami perubahan dalam struktur dan glikasi jika tidak disimpan dalam kondisi yang ideal. Menyimpan sampel pada suhu dingin (2-8°C) adalah cara yang efektif untuk mengurangi risiko ini (Glick dkk., 2003). Namun, hal ini bisa dikontrol dengan memastikan suhu refrigerator stabil dan sampel tidak terlalu sering keluar masuk refrigerator.

B. Kerangka Teori



Gambar 3. Kerangka Teori

C. Hubungan Antar Variabel



Gambar 4. Hubungan Antarvariabel

D. Hipotesis Penelitian

Ada perbedaan kadar HbA1c pada spesimen *whole blood* pasien diabetes melitus setelah disimpan selama 3 hari dan 7 hari pada suhu 2-8°C.