

Pemeriksaan Laboratorium pada Hemoglobin Terглиkasi (HbA1C) : Review Standarisasi dan Implementasi Klinis

Raja Iqbal Mulya Harahap, Tiene Rostini, Nida Suraya

Fakultas Kedokteran Universitas Padjadjaran, Indonesia

* Email untuk Korespondensi: rajanafiah@gmail.com

ABSTRAK

Diabetes melitus merupakan masalah kesehatan masyarakat di seluruh dunia. Hemoglobin A1c (HbA1c) adalah derivat dari hemoglobin A (HbA), dengan penambahan glukosa pada rantai β . Pada tahun 2010 ADA memasukkan HbA1c sebagai salah satu kriteria diagnosis diabetes. Tujuan dari penelitian untuk mengevaluasi metode-metode standar yang digunakan dalam pengukuran HbA1c serta meninjau bagaimana hasil pengukuran tersebut diterapkan dalam praktik klinis. Metode pemeriksaan HbA1c cukup banyak namun yang telah terstandarisasi oleh NGSP dan saat ini banyak dipakai diantaranya yaitu metode immunoassay, ion-exchange HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*), enzimatik, boronate affinity chromatography, dan capillary electrophoresis. Pemilihan metode sangat dipengaruhi oleh populasi pasien dan biaya. Metode yang dapat dipilih untuk populasi hemoglobinopati yaitu metode boronate affinity HPLC dan enzimatik. Pelaporan hasil HbA1c dalam persen sesuai dengan standar NGSP atau mmol/mol sesuai dengan standar IFCC yang keduanya dapat dikonversi satu sama lain dengan master of equation. Hasil pemeriksaan HbA1c dipengaruhi oleh berbagai faktor yang paling penting adalah Hb varian. Kesimpulan dari penelitian ini yaitu standarisasi metode pemeriksaan HbA1c oleh NGSP dan IFCC telah memastikan konsistensi hasil yang memungkinkan konversi nilai HbA1c antar sistem yang berbeda.

Kata kunci:

HbA1C, hemoglobin terglykasi, diabetes mellitus, metode pemeriksaan

Keywords:

HbA1C, glycated hemoglobin, diabetes mellitus, examination method

Diabetes mellitus is a public health problem worldwide. Hemoglobin A1c (HbA1c) is a derivative of hemoglobin A (HbA), with the addition of glucose to the β chain. In 2010 the ADA included HbA1c as one of the criteria for diagnosing diabetes. The purpose of the study was to evaluate the standard methods used in the measurement of HbA1c and to review how the results of these measurements are applied in clinical practice. There are quite a lot of HbA1c examination methods, but those that have been standardized by the NGSP and are currently widely used, including immunoassay methods, ion-exchange HPLC (High Performance Liquid Chromatography), enzymatic, boronate affinity chromatography, and capillary electrophoresis. The choice of method is greatly influenced by the patient population and cost. The methods that can be chosen for hemoglobinopathy populations are the boronate affinity HPLC and enzymatic methods. Reporting of HbA1c results in percent according to NGSP standards or mmol/mol according to IFCC standards both can be converted to each other with a master of equation. The results of the HbA1c test are influenced by various factors, the most important of which is the Hb variant. The conclusion of this study is that the standardization of HbA1c examination methods by NGSP and IFCC has ensured the consistency of results that allow the conversion of HbA1c values between different systems.

Ini adalah artikel akses terbuka di bawah lisensi [CC BY-SA](https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/).
This is an open access article under the [CC BY-SA](https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/) license.

PENDAHULUAN

Diabetes adalah suatu penyakit metabolik kronis yang ditandai dengan insufisiensi insulin, hiperglikemia dan sejumlah risiko komplikasi seperti kebutaan, gagal ginjal, serangan jantung, stroke dan amputasi tungkai bawah (Maria, 2021; Mulyono, 2022). Prevalensi diabetes di seluruh dunia pada tahun 2019 yaitu sebesar 9,3% atau sekitar 463 juta orang dan diperkirakan akan terus bertambah hingga 578 juta orang pada tahun 2030.1 Indonesia berada diperingkat ke-7 diantara 10 negara dengan jumlah penderita terbanyak. Data dari Riset Kesehatan Dasar (RISKESDAS) tahun 2018 menjelaskan bahwa prevalensi diabetes melitus nasional sebesar 8,5% atau sekitar 20,4 juta orang Indonesia terkena diabetes melitus. Pada tahun 2010 ADA memasukkan HbA1c ke dalam kriteria diagnosis diabetes. Nilai HbA1c $\geq 6,5\%$ telah ditetapkan untuk diagnosis diabetes sedangkan nilai HbA1c antara 5,7% hingga 6,4% mengindikasikan risiko tinggi untuk menjadi diabetes.

Standardisasi metode pemeriksaan HbA1c telah diupayakan oleh berbagai kelompok ahli guna memperoleh manfaat yang optimal dari tes ini dalam mengendalikan risiko komplikasi diabetes diantaranya yaitu, *American Association for Clinical Chemistry (AACC)* melalui *National Glycohemoglobin Standardization Program (NGSP)* yang mengacu kepada referensi *Diabetes Control and Complications Trial (DCCT)*, dan *International Federation of Clinical Chemistry (IFCC)* (Burtis & Bruns, 2014). Manfaat HbA1c baik untuk mendiagnosis maupun memantau terapi serta komplikasi diabetes mendorong kita untuk mengetahui metode pemeriksaan HbA1c terstandar agar bisa memberikan pelayanan kesehatan yang optimal (Fandinata & Ernawati, 2020; Hayati & Jumaryatno, 2016).

Definisi dan Pembentukan HbA1C

Hemoglobin (Hb) adalah protein globular dengan diameter 6,4 nanometer dan berat molekul sekitar 64.500 Dalton (Da). Hemoglobin pada manusia dewasa terdiri dari 97% hemoglobin A (HbA), 2,5% hemoglobin A2 (HbA2), dan 0,5% hemoglobin Fetus (HbF). Hemoglobin A terbentuk dari empat rantai polipeptida yaitu dua rantai α dan dua rantai β . 4 Berdasarkan analisis kromatografi, HbA dapat dipisahkan lagi menjadi fraksi atau hemoglobin minor yaitu fraksi pertama dianggap sebagai hemoglobin A murni sehingga dinamai HbA0, fraksi selanjutnya diberi nama HbA1a, HbA1b dan HbA1c. Hemoglobin terglikasi memiliki muatan negatif lebih banyak sehingga pada elektroforesis molekul ini dapat bergerak cepat dan lebih mudah terdeteksi.3 Pembentukan hemoglobin terglikasi dapat mengindikasikan adanya kelebihan glukosa dalam darah. Ketika kadar glukosa dalam darah tinggi, molekul glukosa akan menempel pada hemoglobin di dalam sel darah merah (*eritrosit*). Ketika kadar glukosa dalam darah tinggi, molekul glukosa akan menempel pada hemoglobin di dalam sel darah merah (*eritrosit*). Pada diabetes, jumlah hemoglobin terglikasi yang tinggi menunjukkan kontrol yang buruk terhadap kadar glukosa dan risiko komplikasi kronik semakin meningkat (Firani et al., 2023; Saeedi et al., 2019).

Hemoglobin A1c (HbA1c) adalah glukosa stabil yang terikat pada gugus N-terminal pada rantai HbA0 membentuk suatu modifikasi pasca translasi sehingga glukosa bersatu dengan kelompok amino bebas pada residu valin N-terminal dari rantai β hemoglobin (Destiani & Chondro, 2018; KK, 2022). Pembentukan hemoglobin terglikasi dapat mengindikasikan adanya kelebihan glukosa dalam darah. Ketika kadar glukosa dalam darah tinggi, molekul glukosa akan menempel pada hemoglobin di dalam sel darah merah (*eritrosit*). Bila keadaan hiperglikemia berlangsung terus, maka akan semakin banyak glukosa yang menempel pada hemoglobin sehingga jumlah hemoglobin terglikasi meningkat. Pada diabetes, jumlah hemoglobin terglikasi yang tinggi menunjukkan kontrol yang buruk terhadap kadar glukosa dan risiko komplikasi kronik semakin meningkat (Saeedi et al., 2019).

Sejarah HbA1C

Hemoglobin A1c pertama kali dipisahkan dari bentuk hemoglobin yang lain oleh Huisman dan Meyering pada tahun 1958. Pada tahun 1962 Hutsman dan Dozy melaporkan peningkatan salah satu fraksi minor hemoglobin pada empat pasien diabetes. Kemudian pada tahun 1968, Bookchin dan Gallop melaporkan adanya suatu komponen hemoglobin pada pasien diabetes tidak terkontrol dan pertama kalinya menandai HbA1c sebagai suatu glikoprotein. Pada tahun 1969 Rahbar et al, kembali menemukan peningkatan salah satu hemoglobin minor pada pasien diabetes. Penggunaan HbA1c untuk memantau derajat kontrol metabolisme glukosa pada pasien diabetes pertama kali diusulkan pada tahun 1976 oleh Ceramie, et al.5 Penelitian selama sembilan tahun oleh Diabetes Control and Complication Trial (DCCT) yang selesai pada tahun 1993 menunjukkan bahwa risiko perkembangan komplikasi kronis diabetes berkorelasi erat dengan derajat kontrol glikemik yang diukur dengan hemoglobin A1c (HbA1c). Penggunaan HbA1c untuk monitoring derajat kontrol

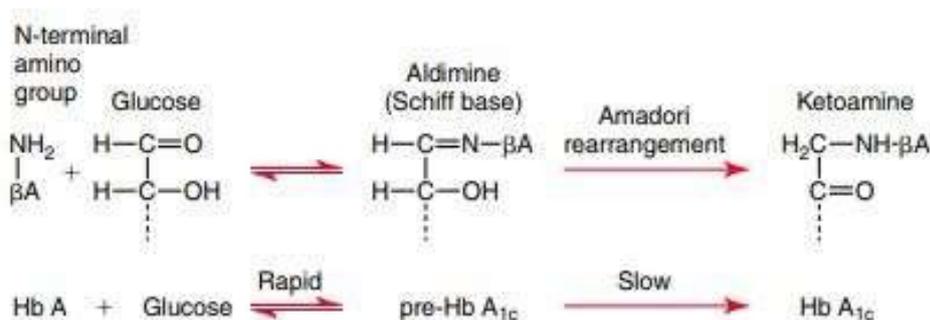
metabolik pada diabetes diadopsi dalam praktik klinis oleh The United Kingdom Prospective Diabetes Study (UKPDS).

Kelompok DCCT menyediakan banyak sekali data mengenai nilai HbA1c terhadap glukosa darah rata-rata. Selain itu, kelompok tersebut juga telah merancang tahapan perkembangan secara spesifik dari target terapi diabetes menggunakan HbA1c sebagai indeks terhadap glukosa darah rata-rata. Namun demikian saat itu belum ada standarisasi untuk pemeriksaan HbA1c diantara laboratorium sehingga pemanfaatan HbA1c belum optimal. Melalui subkomitennya, DCCT merekomendasikan standar metode pemeriksaan HbA1c yang dapat dijadikan referensi sekaligus hasil pemeriksaannya dapat dihubungkan dengan glukosa rata-rata dan risiko komplikasi kronik, sambil terus mengembangkan untuk memperoleh HbA1c murni yang standar sebagai kontrol (Burtis & Bruns, 2014; Yusan, 2020).

Sementara itu, *American Association of Clinical Chemistry* (AACC) melalui subkomitennya mengeluarkan *National Glycohemoglobin Standardization Program* (NGSP) pada tahun 1996. Program tersebut tidak hanya bersifat lokal tetapi internasional dan mengacu pada metode referensi dari DCCT. Pada tahun 2014, *American Diabetes Association* (ADA) merekomendasikan penggunaan HbA1c untuk mendiagnosis diabetes menggunakan metode terstandar dari NGSP dengan *cut-off* HbA1c $\geq 6,5\%$. Pada tahun 1995, *International Federation for Clinical Chemistry* (IFCC) juga membentuk kelompok kerja yang bertujuan untuk mengembangkan metode internasional yang standar/kalibrator HbA1c murni. Pertemuan konsensus pada tahun 2007 menghasilkan kesepakatan bahwa hasil HbA1c dilaporkan dalam unit IFCC dengan satuan mmol/mol dan unit dari NGSP dengan satuan persen (Burtis & Bruns, 2014).

Metabolisme HbA1C

Proses pembentukan HbA1c terjadi melalui reaksi kimia akibat paparan glukosa yang beredar dalam darah dan tidak dikatalisis oleh enzim. Kebanyakan monosakarida, termasuk glukosa, galaktosa dan fruktosa, ketika berada dalam sirkulasi darah manusia dapat secara spontan berikatan dengan hemoglobin. Proses dimana gula menempel pada hemoglobin disebut proses glikasi (Dian Andarwati et al., 2019; Harna et al., 2022). Sebelumnya untuk proses tersebut digunakan istilah glikosilasi, namun sampai penelitian lebih lanjut maka istilah glikasi saat ini lebih banyak dipakai daripada istilah glikosilasi karena lebih merepresentasikan proses yang sesungguhnya (reaksi non-enzimatis). Istilah glikasi juga direkomendasikan oleh *The Joint Commission on Biochemical Nomenclature of International Union of Pure and Applied Chemistry*. Pembentukan HbA1c dimulai dari kondensasi glukosa dengan residu valin terminal-N pada setiap rantai β dari HbA kemudian membentuk *Schiff base* yang bersifat tidak stabil (aldimine, pre HbA1c). *Schiff base* dapat berdisosiasi atau mengalami suatu proses penataan ulang yang disebut *Amadori rearrangement* membentuk ketoamin yang stabil yaitu HbA1c (Burtis & Bruns, 2014). Proses pembentukan HbA1c dapat terlihat pada gambar berikut ini;



Gambar 1. Pembentukan HbA1c

Dikutip dari: Tietz³

Sintesis HbA1c bersifat ireversibel dan konsentrasi HbA1c tergantung pada konsentrasi glukosa dan umur eritrosit (rata-rata 120 hari). Hubungan langsung antara HbA1c dan rata-rata glukosa darah terjadi karena eritrosit terus menerus terglykasi selama 120 hari masa hidupnya. Karena laju pembentukan HbA1c sebanding dengan konsentrasi glukosa darah dan umur eritrosit, maka konsentrasi HbA1c dapat merepresentasikan nilai glukosa darah dalam 2 hingga 3 bulan terakhir. Setiap kondisi yang mempengaruhi umur eritrosit akan mempengaruhi kadar HbA1c. Kadar glukosa darah dalam satu bulan terakhir berkontribusi terhadap 50%

Pemeriksaan Laboratorium pada Hemoglobin Terglykasi (HbA1C) : Review Standarisasi dan Implementasi Klinis

pembentukan HbA1c saat itu. Kadar glukosa darah dalam 2-3 bulan terakhir berkontribusi terhadap 25% pembentukan HbA1c (Koenig et al., 1976; Zheva Aprillia, 2024).

Tujuan dari penelitian untuk mengevaluasi metode-metode standar yang digunakan dalam pengukuran HbA1C serta meninjau bagaimana hasil pengukuran tersebut diterapkan dalam praktik klinis. Penelitian ini berupaya mengidentifikasi perbedaan dan keseragaman dalam berbagai teknik pengukuran HbA1C, serta mengevaluasi keakuratan dan konsistensi hasil yang diperoleh. Selain itu, penelitian ini juga bertujuan untuk mengkaji dampak implementasi hasil pengukuran HbA1C dalam diagnosis dan manajemen diabetes mellitus di lingkungan klinis. Manfaat dari penelitian ini sangat signifikan bagi bidang medis dan kesehatan. Dengan melakukan review terhadap standarisasi metode pengukuran HbA1C, penelitian ini dapat membantu meningkatkan akurasi diagnosis diabetes, yang pada gilirannya dapat mempengaruhi kualitas perawatan dan pengelolaan penyakit ini. Penelitian ini juga dapat memberikan rekomendasi praktis bagi laboratorium dan profesional medis mengenai metode terbaik yang harus digunakan, serta mengarahkan kebijakan kesehatan yang lebih baik dalam menangani diabetes. Dengan demikian, hasil dari penelitian ini diharapkan dapat berkontribusi pada peningkatan standar pelayanan kesehatan, mengurangi risiko kesalahan diagnosis, dan mendukung pengembangan strategi pengobatan yang lebih efektif.

METODE

Penelitian ini menggunakan desain deskriptif dengan metode kajian pustaka. Data dikumpulkan melalui penelusuran literatur dari jurnal-jurnal ilmiah, buku teks medis, dan laporan penelitian yang relevan dengan topik HbA1c dan diabetes mellitus. Sumber data mencakup publikasi dari tahun 2000 hingga 2023 yang tersedia dalam basis data elektronik seperti PubMed, Google Scholar, dan portal jurnal medis lainnya.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Metode – Metode Pemeriksaan Laboratorium pada HbA1C

Ada banyak metode pemeriksaan HbA1c, namun secara umum memiliki prinsip yang sama yaitu memisahkan antara hemoglobin terglykasi dengan yang tidak terglykasi. Metode pemeriksaan HbA1c dapat dibedakan berdasarkan :

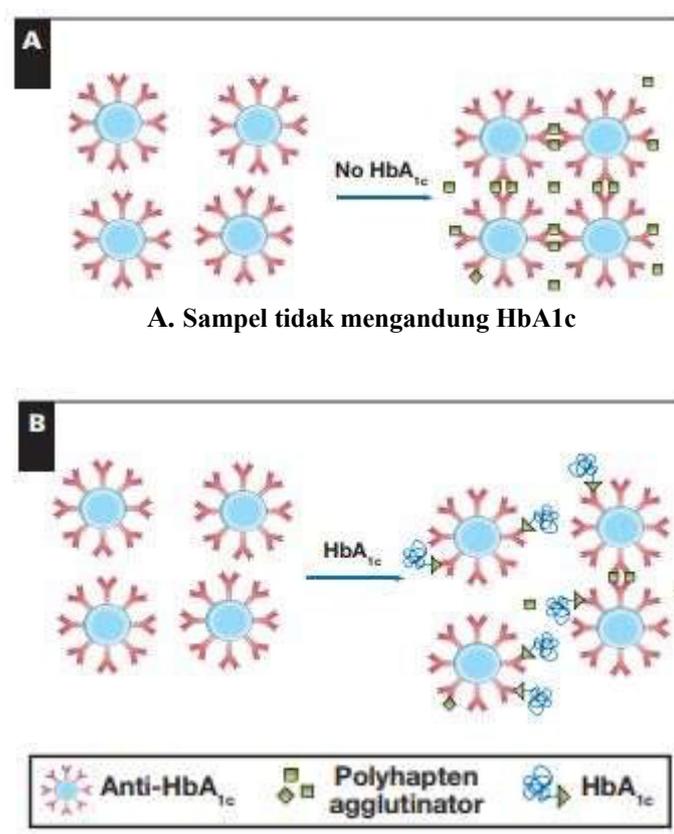
- 1) Perbedaan muatan (*charge differences*), contoh metodenya yaitu *ion-exchange chromatography*, *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC), elektroforesis, dan *isoelectric focusing*
- 2) Perbedaan struktur, contoh metodenya yaitu *immunoassay*, *affinity chromatography*
- 3) Reaksi kimia, metodenya yaitu *enzyme assay*

Pemilihan metode pemeriksaan HbA1c dipengaruhi oleh beberapa faktor termasuk volume sampel, populasi pasien dan biaya. Saat memilih metode uji, laboratorium harus mempertimbangkan karakteristik populasi pasien yang akan dilayani misalnya prevalensi tinggi hemoglobinopati atau pasien gagal ginjal. Rekomendasi dari ADA bahwa laboratorium yang memeriksakan HbA1c hendaknya menggunakan alat dan metode yang sudah tersertifikasi oleh NGSP yang selalu diperbarui setiap tahun. 3 *Up-date* terbaru dari NGSP tahun 2021 ada lima metode pemeriksaan HbA1c yaitu *immunoassay*, *ion-exchange HPLC*, *borronate affinity*, *metode enzimatik* dan *capillary electrophoresis*.

Metode *immunoassay*

Metode *immunoassay* saat ini adalah yang paling banyak digunakan berdasarkan data dari *College of American Pathology (CAP)*. Metode ini menggunakan antibodi yang akan menangkap produk Amadori (ketoamin) dan asam amino terdekat di N-terminal pada rantai β hemoglobin A (HbA). Teknik *immunoassay* generasi pertama menangkap 4 hingga 10 asam amino pada rantai β sehingga pada sampel dengan variasi Hb yang sering seperti HbS dan HbC dapat menjadi faktor pengganggu. Prinsip metode ini yaitu apabila sampel pasien tidak mengandung HbA1c maka anti-HbA1c monoklonal antibodi yang terikat pada lateks akan berikatan dengan aglutinator (polihapten yang merupakan polimer sintesis yang mengandung epitop multipel HbA1c) sehingga terjadi aglutinasi dan menghasilkan kompleks molekul yang tidak larut. Produk akhir reaksi ini menghasilkan pendaran cahaya (*light scattering*) sehingga meningkatkan absorbansi. Sebaliknya jika dalam sampel pasien terdapat HbA1c, maka akan berkompetisi dengan aglutinator untuk berikatan dengan anti-HbA1c antibodi monoklonal sehingga tidak terjadi aglutinasi dan pendaran cahaya berkurang. 3 Metode ini memiliki kelebihan yaitu tidak akan menangkap bentuk labil (*Schiff base*) dan Hb varian seperti HbF, HbA2 dan hemoglobin terkarbamilasi. Selain itu metode ini relatif lebih sederhana dan tidak mahal.

Proporsi relatif hemoglobin total terglykasi akan dihitung dan dilaporkan pra perlakuan untuk menghilangkan fraksi labil karena hanya produk Amadori yang akan terdeteksi. Semua varian hemoglobin yang terglykasi pada N-terminal rantai β dan memiliki epitop yang identik dengan HbA1c akan diukur pada pemeriksaan ini. Sampel pemeriksaan menggunakan *whole blood* yang ditambah antikoagulan EDTA, dibaca pada panjang gelombang 340 dan 700 nanometer (nm) untuk HbA1c dan 405 dan 700 nm untuk hemoglobin total. Nilai kisaran pengukuran yaitu 5,0-25,0 g/dL untuk hemoglobin, 0,3-2,6 g/dL untuk HbA1c, 3,6-16,0% untuk rasio HbA1c. Nilai rujukannya yaitu 4,5-6,2%. Prinsip pemeriksaan HbA1C dengan metode ini dapat dilihat pada gambar berikut:



A. Sampel tidak mengandung HbA1c

B. Sampel mengandung HbA1c

Gambar Gambar 2. Proses metode *immunoassay*

Dikutip dari: Rhea JM, Milonaro R¹²

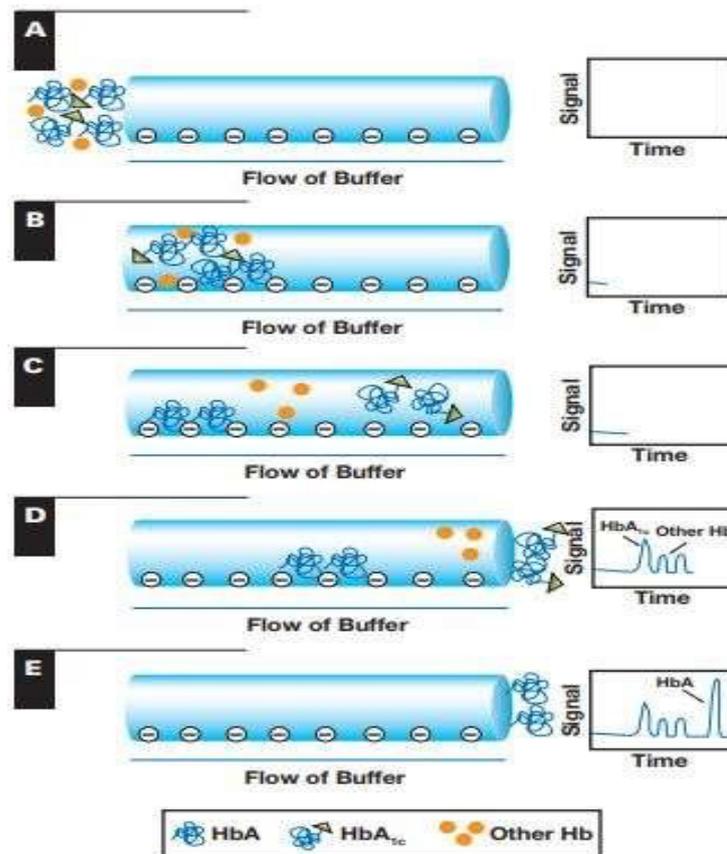
1. Metode *Ion-exchange High Performance Liquid Chromatography (HPLC)*

Metode ini adalah metode pengukuran HbA1c kedua terbanyak dipakai berdasarkan data CAP (*College of American Pathologist*) dan merupakan metode standar pertama yang direkomendasikan oleh NGSP. Metode HPLC merupakan baku emas dalam pengukuran HbA1c. Metode ini memisahkan fraksi hemoglobin berdasarkan *cation-exchange* berbasis kromatografi. Lisat dari eritrosit akan masuk ke dalam kolom yang mengandung resin bermuatan negatif, lalu molekul bermuatan positif akan berjalan melewati kolom lebih lambat daripada molekul yang bermuatan negatif. Molekul HbA1c akan melewati kolom lebih awal karena lebih negatif dibandingkan HbA0 dan hasilnya akan keluar berupa puncak.

Prinsip pemeriksaannya yaitu darah dengan antikoagulan EDTA diencerkan dengan reagen hemolisis yang mengandung borat. Sampel kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 30 menit dengan tujuan untuk meniadakan bentuk labil (*Schiff base*). Langkah selanjutnya adalah

menambahkan buffer yang dapat meningkatkan kekuatan ionik untuk melewati kolom. Deteksi hasil dibaca pada panjang gelombang 415 dan 690 nm; hasilnya dengan mengukur area dibawah kurva kemudian dihitung rasio antara area kurva HbA1c dengan area kurva hemoglobin total.

Metode ini punya kelebihan diantaranya yaitu memiliki resolusi yang tinggi sehingga mampu mendeteksi fraksi hemoglobin lainnya sehingga dapat memeriksa semua sampel dari pasien termasuk sampel dengan Hb varian, waktu analisis cepat hanya 3 sampai 5 menit, kemudian memiliki *coefficient of variation* yang rendah yaitu kurang dari 2,0% menurut survei CAP tahun 2014 sehingga presisinya cukup tinggi. Kekurangan dari metode ini yaitu apabila dalam proses analitiknya terjadi hemolisis maka akan menyebabkan hasil rendah palsu.³ Selain itu metode ini membutuhkan instrumen khusus, pengerjaan oleh tenaga terlatih, dan relatif mahal. Proses metode HPLC dapat terlihat seperti gambar berikut ini:



Gambar 3. Proses HPLC untuk pemeriksaan HbA1c

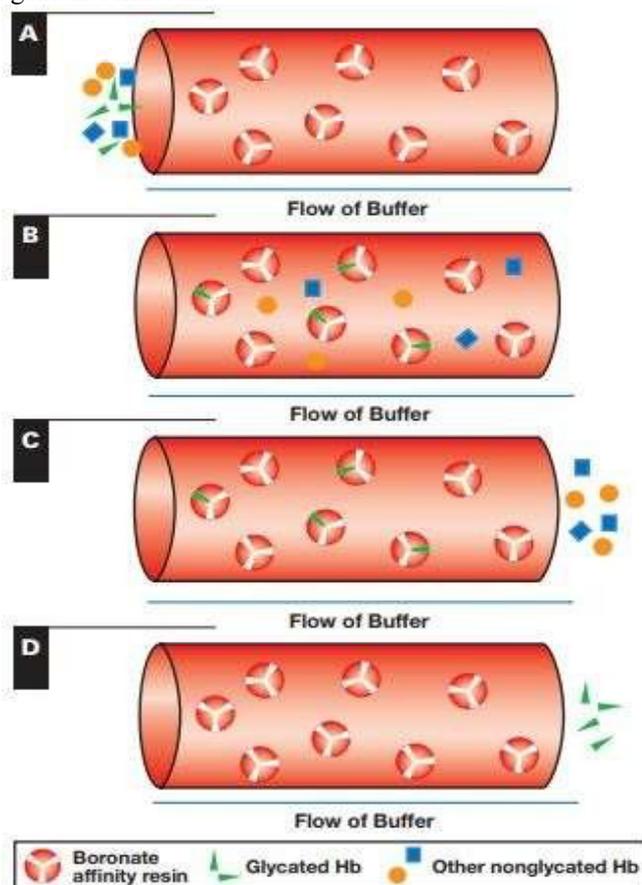
- Lisat eritrosit masuk ke dalam kolom bermuatan negatif
 - Molekul bermuatan negatif bergerak lebih cepat
 - Molekul bermuatan positif terikat dengan resin bermuatan negatif Molekul HbA_{1c} telah melewati kolom
 - Molekul HbA lainnya dapat juga terdeteksi
- Dikutip dari: Rhea JM, Milonaro R¹²

2. Metode *Borrionate affinity chromatography*

Metode *borrionate affinity* adalah metode spesifik yang mengenali struktur gugus cis-diol dari glukosa yang terikat pada Hb. Pada metode ini digunakan kolom gel afinitas untuk memisahkan

hemoglobin terglykasi dengan yang tidak terglykasi, dimana hemoglobin terglykasi akan terikat pada kolom. *Boronic acid* yaitu m-Aminophenylboronic acid membentuk cross-linking dengan agarose atau matriks lain (glass fiber) yang tidak bergerak (*immobilized*). *Boronic acid* akan mengenali gugus cis-diol dari glukosa yang terikat pada Hb kemudian berikatan membentuk lima kompleks cincin yang reversibel sehingga Hb yang terglykasi akan tertahan pada kolom; sementara yang tidak terglykasi tidak akan terikat pada kolom.

Setelah terjadi ikatan, *buffer acid* ditambahkan untuk melulusi Hb terglykasi. Absorbansi dari fraksi yang terikat dan yang tidak terikat dibaca pada panjang gelombang 415 nm, yang digunakan untuk menghitung persentasi dari Hb yang terglykasi. Proses pemeriksaan HbA1c dengan metode ini dapat terlihat pada gambar berikut ini:



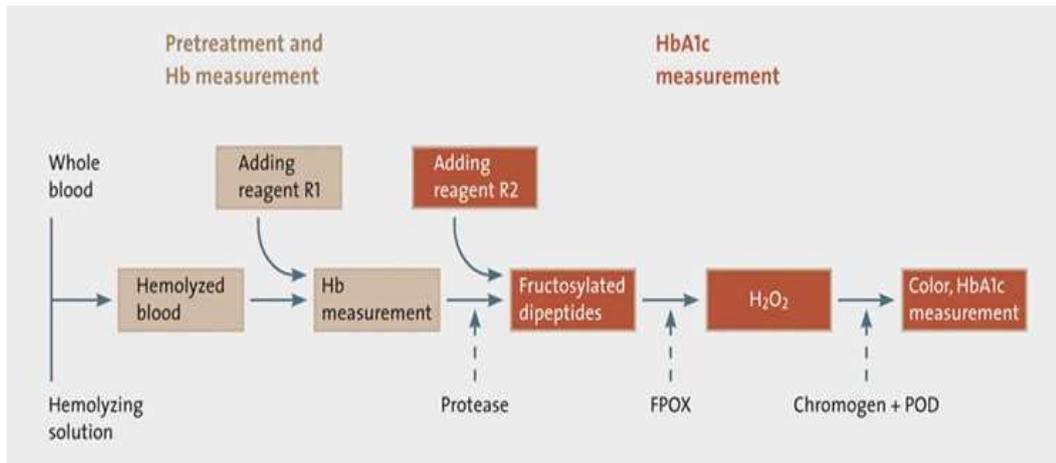
Gambar 4. Boronate affinity chromatography

- A.** Lisat eritrosit masuk ke dalam kolom yang berisiresin yang mengandung *boronic acid*
 - B.** Hemoglobin terglykasi terikat dengan *boronic acid*
 - C.** Hemoglobin tidak terglykasi melewati kolom
 - D.** Penambahan *buffer acid* untuk melepaskan hemoglobin terglykasi dari ikatan dengan *boronicacid*
- Dikutip dari: Rhea JM, Milonaro R¹²

3. Metode Enzimatik

Pada metode enzimatik sampel darah *whole blood* dengan antikoagulan EDTA akan dilisiskan untuk dilakukan pre-treatment dan pengukuran hemoglobin total yaitu dengan cara eritrosit yang lisis ditambah sodium nitrit untuk mengoksidasi total hemoglobin menjadi methemoglobin. Kemudian

ditambahkan sodium azide yang menghasilkan azidomethemoglobin yang dapat diukur secara kolorimetri dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 476 nm sehingga diperoleh kadar hemoglobin total. Reaksi selanjutnya yaitu mengukur kadar HbA1c dimana protease ditambahkan untuk menghasilkan fructosyl dipeptide dari N-terminal rantai β hemoglobin kemudian dihidrolisis dengan bantuan enzim *Fructosyl Peptide Oxidase* (FPOX) menghasilkan hidrogen peroksidase yang akan bereaksi dengan kromogen; kemudian warna yang dihasilkan akan diukur absorbansinya pada panjang gelombang 660 nm.^{3,16} Hasil analisis dengan metode ini berupa nilai HbA1c dalam persen dengan mengukur total hemoglobin terlebih dahulu.¹⁶ Metode ini kurang dipengaruhi oleh Hb varian. Reaksi pada metode enzimatik dapat dilihat seperti pada gambar berikut ini (McPherson, 2016).

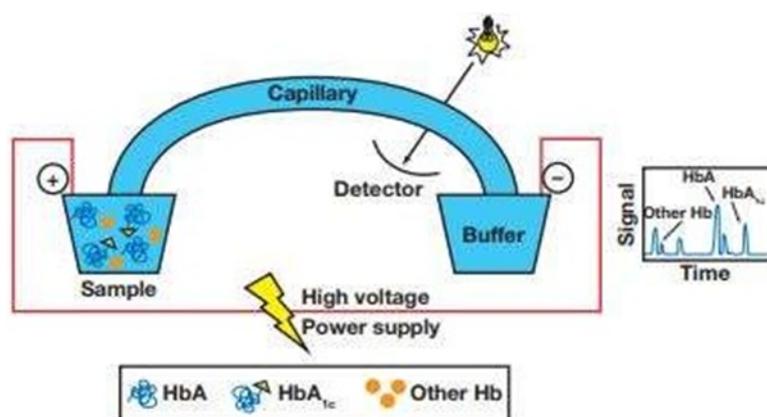


Gambar 5. Metode enzimatik
Dikutip dari: HbA1cnet.com¹⁶

Metode enzimatik memiliki berbagai keuntungan yaitu tidak dipengaruhi oleh Hb varian, Hb terkarbamilasi dan fraksi labil (*Schiff base*), tidak dipengaruhi oleh kontaminasi lateks seperti pada metode *immunoassay*, waktu pengerjaan cepat. Metode enzimatik terbaru, tidak seperti kebanyakan alat otomatis saat ini, yang menggunakan dua channel, satu untuk mengukur hemoglobin total, yang kedua untuk mengukur hemoglobin terglukasi, metode ini hanya menggunakan satu instrumen (satu channel) karena tidak mengukur hemoglobin total terlebih dahulu, sehingga lebih mudah dan sederhana. Kekurangannya adalah biaya relatif mahal.

4. Metode *capillary eletrophoresis*

Teknik untuk memisahkan komponen suatu sampel dengan menggunakan suatu kapiler yang sempit yang diisi dengan running buffer, lalu diikuti dengan penempatan ke dalam medan listrik disebut dengan *capillary eletrophoresis* atau elektroforesis kapiler. HbA1c pertama kali diidentifikasi pada tahun 1968 dengan pemeriksaan elektroforesis konvensional menggunakan gel agar pada pH 6,2. Kelebihan metode *capillary eletrophoresis* dibandingkan dengan metode konvensional yaitu memiliki resolusi yang lebih tinggi karena memiliki voltase yang lebih tinggi, jumlah sampel lebih sedikit, proses pemeriksaan berjalan lebih cepat, memberikan akurasi dan presisi yang lebih baik, menggunakan lebih sedikit reagen dan lebih mudah untuk diotomasi. Prinsip metode ini yaitu pemisahan molekul bermuatan berdasarkan mobilitas elektroforesis yang dipengaruhi oleh pH elektrolit dan aliran elektro-osmotik. Sampel dimasukkan ke dalam inlet kapiler. Ketika tegangan tinggi diaplikasikan di ujung awal kapiler, molekul sampel dipisahkan oleh *electro-osmotic flow* (EOF). Molekul yang bermuatan positif akan bergerak lebih cepat ke arah outlet kapiler, sedangkan molekul yang bermuatan negatif (HbA1c) bergerak lebih lambat. Saat molekul hampir mendekati outlet terdapat alat detektor yang akan mendeteksi dan mengukur molekul yang lewat. Pada metode ini varian Hb dapat terdeteksi. Mekanisme pemeriksaan *capillary eletrophoresis* dapat terlihat pada gambar berikut ini:



Gambar 6. Metode capillary electrophoresis
Dikutip dari: Rhea JM, Milonaro R¹²

Standardisasi Pemeriksaan HbA1C

Upaya penyeragaman metode pemeriksaan HbA1c agar diperoleh hasil yang standar telah dilakukan oleh berbagai negara dan kelompok ahli. Amerika melalui NGSP yang mengacu kepada referensi DCCT telah menetapkan standar untuk metode dan pelaporan nilai HbA1c yaitu dalam persen. Di Swedia digunakan sistem Mono S-HbA1c, sedangkan sistem KO500 digunakan di Jepang sesuai dengan kesepakatan para ahli di negara tersebut yaitu *Japanese Diabetes Society (JDS)/Japanese Society of Clinical Chemistry (JSCC)*.¹⁵ Sementara itu IFCC (*International Federation for Clinical Chemistry*) mengembangkan juga standarisasi pemeriksaan HbA1c menggunakan kalibrator HbA1c dan HbA0 murni dengan metode HPLC *electrospray ionization mass spectrometry* (ESI- MS). Metode yang dipakai oleh IFCC ini (1) memerlukan waktu yang lama, (2) tekniknya kompleks, dan (3) tidak dapat diimplementasikan untuk pemeriksaan rutin sampel pasien.³ Namun demikian *American Diabetes Association (ADA)*, *European Association for Study of Diabetes (EASD)* dan IFCC telah sepakat bahwa HbA1c akan dilaporkan dalam unit IFCC (satuan internasional) yaitu mmol/mol. Suatu *master of equation* yang memungkinkan konversi nilai HbA1c dari berbagai sistem yang berbeda (NGSP, Mono-S, KO500) ke satuan internasional dan sebaliknya telah dikembangkan. Validitas *master of equation* dari NGSP dan JDS/JSCC dievaluasi setahun dua kali. Persamaan *master of equation* dapat dilihat pada gambar berikut ini:

Conversion IFCC- to DCM-units	Conversion DCM-units into IFCC-units
$NGSP = 0.0915 * IFCC + 2.15 \%$	$IFCC = 10.93 * NGSP - 23.5 \text{ mmol/mol}$
$JDS/JSCC = 0.0927 * IFCC + 1.73 \%$	$IFCC = 10.79 * JDS/JSCC - 18.7 \text{ mmol/mol}$
$Mono S = 0.0989 * IFCC + 0.88 \%$	$IFCC = 10.11 * Mono S - 8.9 \text{ mmol/mol}$

Gambar 7. Equation Master
Dikutip dari: IFCC

KESIMPULAN

Hemoglobin A1c (HbA1c) merupakan indikator yang sangat penting dalam diagnosis dan manajemen diabetes mellitus. HbA1c memiliki kelebihan dibandingkan pengukuran glukosa darah harian karena memberikan gambaran rerata glukosa darah selama 2-3 bulan terakhir dan memiliki korelasi yang baik dengan risiko komplikasi jangka panjang diabetes, terutama retinopati.

Beberapa metode pemeriksaan HbA1c telah dikembangkan dan diakui secara internasional, termasuk immunoassay, ion-exchange HPLC, boronate affinity chromatography, metode enzimatik, dan capillary

Pemeriksaan Laboratorium pada Hemoglobin Terглиkasi (HbA1C) : Review Standarisasi dan Implementasi Klinis

electrophoresis. Pemilihan metode yang tepat sangat dipengaruhi oleh karakteristik populasi pasien dan biaya. Metode immunoassay dan HPLC merupakan metode yang paling banyak digunakan karena akurasi dan keandalannya.

Standardisasi metode pemeriksaan HbA1c oleh NGSP dan IFCC telah memastikan konsistensi hasil yang memungkinkan konversi nilai HbA1c antar sistem yang berbeda. Meskipun demikian, faktor-faktor seperti varian Hb dan umur eritrosit dapat mempengaruhi hasil pemeriksaan HbA1c dan perlu diperhatikan dalam interpretasi hasil. Oleh karena itu, pemahaman yang mendalam tentang metode pemeriksaan dan standardisasi HbA1c sangat penting untuk memberikan pelayanan kesehatan yang optimal bagi pasien diabetes.

REFERENSI

- Burtis, C. A., & Brunis, D. E. (2014). *Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics-E-Book: Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics-E-Book*. Elsevier Health Sciences.
- Destiani, A. B., & Chondro, F. (2018). Hubungan kadar hemoglobin A1c dengan kualitas tidur pada pasien diabetes mellitus tipe-2. *Jurnal Biomedika Dan Kesehatan*, 1(1), 93–100.
- Dian Andarwati, D. A., Murti, B., & Sulaeman, E. S. (2019). *Association between carbohydrate, vitamin C, vitamin E, and HBA1C level*.
- Fandinata, S. S., & Ernawati, I. (2020). *Management terapi pada penyakit degeneratif (diabetes mellitus dan hipertensi): mengenal, mencegah dan mengatasi penyakit degeneratif (diabetes mellitus dan hipertensi)*. Penerbit Graniti.
- Firani, N. K., Fatonah, S., Arsana, P. M., Waafi, A. K., & Kristyoadi, S. A. (2023). *Deteksi Kelainan Hemostasis pada Penderita Diabetes Melitus Tipe 2 dengan Metode Tromboelastografi*. Universitas Brawijaya Press.
- Harna, H., Efriyanurika, L., Novianti, A., Sa'pang, M., & Irawan, A. M. A. (2022). Status Gizi, Asupan Zat Gizi Makro dan Kaitannya dengan Kadar HbA1c PADA Pasien Diabetes Melitus Tipe 2. *Poltekita: Jurnal Ilmu Kesehatan*, 15(4), 365–372.
- Hayati, F., & Jumaryatno, P. (2016). *Aktivitas Ekstrak Etanolik Daun Kangkung Darat (Ipomoea reptans Poir.) Terstandar Sebagai Antihiperqlikemia Terhadap Kadar HbA1c Dan Kadar Alt Pada Tikus Jantan Galur Wistar Yang Diinduksi Streptozotosin*.
- KK, I. F. J. (2022). Efektivitas Perbaikan Gaya Hidup dan Dampaknya Pada Kadar HbA1c Pada Remaja Overweight dan Obesitas yang dimotivasi Melalui Media Sosial: Literature Review. *Lentera Perawat*, 3(2), 66–76.
- Koenig, R. J., Peterson, C. M., Jones, R. L., Saudek, C., Lehrman, M., & Cerami, A. (1976). Correlation of glucose regulation and hemoglobin A1c in diabetes mellitus. *New England Journal of Medicine*, 295(8), 417–420.
- Maria, I. (2021). *Asuhan keperawatan diabetes mellitus dan asuhan keperawatan stroke*. Deepublish.
- McPherson, R. A. (2016). *Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods, 22/e*. Elsevier India.
- Mulyono, M. T. (2022). *Hubungan Gambaran Antara Nilai Ankle Brachial Index Dan Doppler Vaskular Dan Derajat Stenosis Pada Pasien Coronary Artery Disease Disertai Diabetes Mellitus Tipe 2= Association Of Ankle Brachial Index And Vascular Doppler And Stenosis Severity In Patient With Coronary Artery Disease And Diabetes Mellitus Type 2*.
- Saeedi, P., Petersohn, I., Salpea, P., Malanda, B., Karuranga, S., Unwin, N., Colagiuri, S., Guariguata, L., Motala, A. A., & Ogurtsova, K. (2019). Global and regional diabetes prevalence estimates for 2019 and projections for 2030 and 2045: Results from the International Diabetes Federation Diabetes Atlas. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 157, 107843.
- Yusan, L. Y. (2020). *Monograf: Pictogram Sebagai Media Edukasi (Pasien Diabetes Melitus Tipe 2)*. Hang Tuah University Press.
- Zheva Aprillia, Y. (2024). *Hubungan Indeks Massa Tubuh (Imt) Dan Kadar Trigliserida Dengan Kadar Hba1c Pada Penderita Diabetes Melitus Tipe 2 Di Rsud Dr. H. Abdul Moeloek Bandar Lampung Bulan Januari-Desember 2023*.