

TESIS

**8-HIDROXY-DEOXYGUANOSINE (8-OHdG) URIN SEBAGAI
BIOMARKER KERUSAKAN OKSIDATIF PADA HIPERTENSI
LANSIA AWAL**

dr. Hardjono Sumarlie

NIM P062181007



PROGRAM PASCASARJANA

UNIVERSITAS HASANUDDIN

MAKASSAR

2022

**8-HYDROXY-DEOXYGUANOSINE (8-OHdG) URIN
SEBAGAI BIOMARKER KERUSAKAN OKSIDATIF
PADA HIPERTENSI LANSIA AWAL**

Tesis

sebagai salah satu syarat untuk mencapai gelar magister

Program Ilmu Biomedik Konsentrasi Anti Aging and Regenerative Medicine

Disusun dan diajukan oleh

Hardjono Sumarlie

NIM : P062181007

kepada

PROGRAM MAGISTER ILMU BIOMEDIK

SEKOLAH PASCASARJANA

UNIVERSITAS HASANUDDIN

MAKASSAR

2022

LEMBAR PENGESAHAN TESIS

**8-HYDROXY-DEOXYGUANOSINE (8-OHdG) URIN SEBAGAI BIOMARKER
KERUSAKAN OKSIDATIF PADA HIPERTENSI LANSIA AWAL**

Disusun dan diajukan oleh

Hardjono Sumarlie

NIM P062181007

Telah dipertahankan di hadapan Panitia Ujian yang dibentuk dalam rangka Penyelesaian Studi Program Magister Ilmu Biomedik Konsentrasi Anti Aging dan Regenerative Medicine Sekolah Pascasarjana Universitas Hasanuddin

Pada tanggal 18 Juli 2022

Dan dinyatakan telah memenuhi syarat kelulusan

Menyetujui

Pembimbing Utama,



Dr. Firdaus Hamid, Ph.D

NIP 197712312002121002

Pembimbing Pendamping,



dr. Arif Santoso, Sp.P., (K), Ph.D. FAPSR

NIP 1977007152006041012

Ketua Program Studi,



Dr. dr. Ika Yusticia, M.Sc

NIP 197701212003122003

Dekan Sekolah Pascasarjana



Prof. dr. Budu, Ph.D., Sp.M(K), M.Med.Ed

NIP 196612311995031009

PERNYATAAN KEASLIAN TESIS DAN PELIMPAHAN HAK CIPTA

Dengan ini saya menyatakan bahwa, tesis berjudul "8-Hydroxy-deoxyguanosine (8-OHdG) Urin Sebagai Biomarker Kerusakan Oksidatif Pada Hipertensi Lansia Awal" adalah benar karya saya dengan arahan dari komisi pembimbingan (dr. Firdaus Hamid Ph.D sebagai Pembimbing Utama dan dr. Arif Santoso Sp.P.,(K),Ph.D.FAPSR sebagai Pembimbing Pendamping). Karya ilmiah ini belum diajukan dan tidak sedang diajukan dalam bentuk apa pun kepada perguruan tinggi mana pun. Sumber informasi yang berasal atau dikutip dari karya yang diterbitkan maupun tidak diterbitkan dari penulis lain telah disebutkan dalam teks dan dicantumkan dalam Daftar Pustaka di tesis ini. Sebagian dari isi tesis ini telah dipublikasikan di Jurnal International Journal of Health Sciences (IJHS) (e- ISSN: 2550-696X) dalam Vol. 6 No. 2 (2022) sebagai artikel dengan judul "8-Hydroxy-deoxyguanosine (8-OHdG) Urin Sebagai Biomarker Kerusakan Oksidatif Pada Hipertensi Lansia Awal".

Dengan ini saya melimpahkan hak cipta dari karya tulis saya berupa tesis ini kepada Universitas Hasanuddin.

Makassar, 18 Juli 2022



Hardjono Sumarlie

NIM P062181007

Ucapan Terima Kasih

Puji dan Syukur Kehadirat Allah SWT, karena berkat limpahan rahmat dan karunia-Nya, penulis dapat menyelesaikan tesis ini dengan judul: "8-HIDROXY-DEOXYGUANOSINE (8-OHdG) URIN SEBAGAI BIOMARKER KERUSAKAN OKSIDATIF PADA HIPERTENSI LANSIA AWAL". Tesis ini disusun sebagai salah satu tugas akhir dalam rangka memenuhi persyaratan untuk memperoleh gelar Magister M.Biomed (AAM) di Pasca Sarjana Universitas Hasanuddin Makassar. Penulis menyadari bahwa tesis dapat diselesaikan berkat dukungan dan bantuan dari berbagai pihak. Penulis mengucapkan terima kasih kepada semua pihak yang secara langsung maupun tidak langsung memberikan kontribusi dalam menyelesaikan tesis ini.

Ucapan terima kasih penulis sampaikan kepada :

1. Prof. dr.Budu, Ph.D.,Sp.M (K), M.Med.Ed. sebagai Dekan Pasca Sarjana Universitas Hasanuddin Makassar
2. Prof. Dr. dr. Haerani Rasyid Sp.PD-KGH SPGK sebagai Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin Makassar
3. dr. Firdaus Hamid, Ph.D dan dr.Arif Santoso, Sp.P (K), Ph.D, FAPSR sebagai pembimbing
4. dr. Arif Santoso, Sp.P (K), Ph.D, FAPSR sebagai Ketua Konsentrasi Program Studi Anti Aging Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin Makassar
5. Prof. Dr. dr. Suryani As'ad, M.Sc.Sp.GK , dr. Agussalim Bukhari, M.Clin.Med.,Ph.D., Sp.GK (K), Dr.dr. A. Alfian Zainuddin, MKM sebagai penguji yang telah memberi masukan serta bimbingan demi kelancaran penelitian.
6. Dr. dr. Ika Yustisia, M.Sc sebagai Ketua Program Studi Ilmu Biomedik Pasca Sarjana Universitas Hasanuddin Makassar
7. Seluruh pihak yang telah memberi kontribusi berupa pemikiran dan motivasi sehingga penulisan tesis dapat diselesaikan dengan baik.

Semoga tesis ini dapat bermanfaat untuk pengembangan ilmu pengetahuan khususnya bidang Ilmu Anti Aging di Universitas Hasanuddin serta bermanfaat bagi para pembaca.

Makassar, 18 Juli 2022

Penulis

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Hardjono Sumarlie', with a horizontal line underneath the name.

(Hardjono Sumarlie)

ABSTRAK


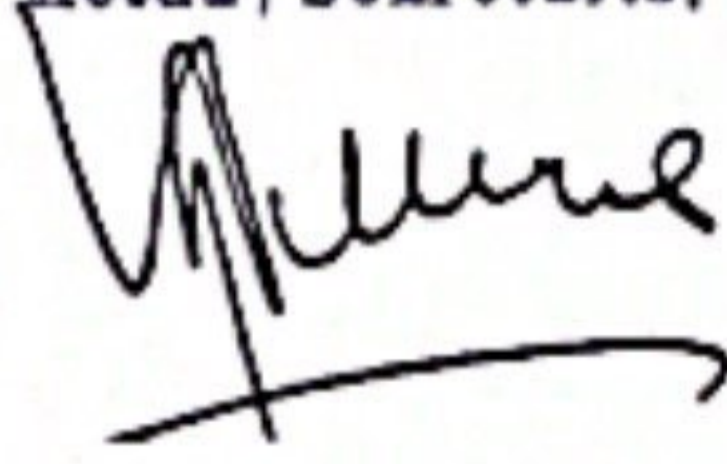
HARDJONO SUMARLIE. *8-Hydroxy-Deoxyguanosine (8-OHdG) Urin sebagai Biomarker Kerusakan Oksidatif pada Hipertensi Lansia Awal (dibimbing oleh Firdaus Hamid dan Arif Santoso)*

Penderita hipertensi menurut JNC VII adalah penderita yang secara klinis memiliki tekanan darah sistolik ≥ 140 mmHg dan diastolik ≥ 90 mmHg. Proses aging ditandai terjadinya berupa pengkakuan pembuluh darah dan penurunan kelenturan arteri. Patomekanisme yang mendasarinya adalah stres oksidatif akibat peningkatan reactive oxygen species (ROS). 8-hydroxy-deoxyguanosine (8-OHdG) adalah produk teroksidasi dari proses perbaikan DNA yang diekskresikan melalui urin, yang dapat digunakan sebagai biomarker stres oksidatif.

Penelitian ini bertujuan untuk menganalisa kadar 8-OHdG urin pada sampel penderita hipertensi dan kontrol sehat umur 46-55 tahun dengan melibatkan sebanyak 80 partisipan. Kuesioner dan rekam medik dikumpulkan untuk memperoleh data klinis. Kadar 8-OHdG urin ditentukan menggunakan *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)*.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa tidak ada perbedaan kadar rata-rata 8-OHdG urin penderita hipertensi (1.871 ± 0.689 ng/mL) dengan kontrol sehat (1.743 ± 0.364 ng/mL). Namun analisis lanjutan menunjukkan kadar 8-OHdG urin pada penderita hipertensi perempuan (2.367 ± 0.206 ng/mL) lebih tinggi secara signifikan ($p=0.01$) dibandingkan laki-laki (1.374 ± 0.644 ng/mL); pada kelompok umur 51-55 tahun (1.963 ± 0.643 ng/mL) tidak ada perbedaan kadar dengan kelompok umur 46-50 tahun (1.680 ± 0.768 ng/mL); penderita hipertensi yang minum obat tidak teratur lebih tinggi (2.374 ± 0.216 ng/mL) secara signifikan ($p=0.001$) dibandingkan yang minum obat teratur (1.535 ± 0.694 ng/mL). Kadar 8-OHdG bisa dijadikan salah satu pertimbangan biomarker pemeriksaan kerusakan oksidatif pada penderita hipertensi.

Kata kunci: hipertensi, aging, 8-OHdG urin, stres oksidatif.

	
GUGUS PENJAMINAN MUTU (GPM) SEKOLAH PASCASARJANA UNHAS	
Abstrak ini telah diperiksa.	Paraf Ketua / Sekretaris.
Tanggal: 15/06/2022	



ABSTRACT


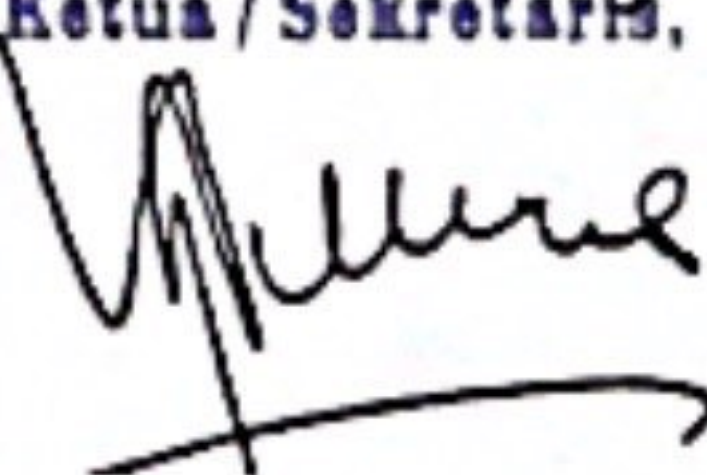
HARDJONO SUMARLIE. *Urinary 8-Hydroxy-deoxyguanosine (8-OHdG) as a Biomarker for Oxidative Damage in Early Elderly Hypertension* (supervised by **Firdaus Hamid** and **Arif Santoso**)

According to JNC VII, patients with hypertension are patients who clinically have systolic and diastolic blood pressure ≥ 140 mmHg and ≥ 90 mmHg, respectively. The aging processes in hypertension are stiffening of the blood vessels and decreasing arterial flexibility. The underlying pathomechanism is oxidative stress due to reactive oxygen species (ROS) elevation. 8-Hydroxy-Deoxyguanosine (8-OHdG) is an oxidized product of DNA repair as a kind of oxidative stress biomarker.

This study aimed to analyze urinary 8-OHdG in hypertensive patients and healthy control aged 46-55 years old by involving 80 participants. Questionnaires and medical records were collected to obtain relevant clinical data. The level of 8-OHdG is measured by the Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA).

The results showed that there is no difference in the average urinary level of urinary 8-OHdG of hypertensive patients (1.871 ± 0.689 ng/mL) with the healthy controls (1.743 ± 0.364 ng/mL). However, further analysis found that the level of urinary 8-OHdG in female hypertensive patients (2.367 ± 0.206 ng/mL) was significantly higher ($p=0.01$) compared to the male hypertensive patients (1.374 ± 0.644 ng/mL); there is no difference in level the 51-55 year age group (1.963 ± 0.643 ng/mL) and the 46-50 year age group (1.680 ± 0.768 ng/mL); hypertensive patients who were inconsistent in taking medication (2.374 ± 0.216 ng/mL) was significantly higher ($p=0.001$) compared to those who took medication regularly (1.535 ± 0.694 ng/mL). The level of urinary 8-OHdG can be considered as one of the examination biomarker of oxidative damage in hypertensive patients.

Keywords: *hypertension, aging, urinary 8-OHdG, oxidative stress*

 GUGUS PENJAMINAN MUTU (GPM) SEKOLAH PASCASARJANA UNHAS	
Abstrak ini telah diperiksa.	Paraf Ketua / Sekretaris.
Tanggal: <u>15/06/2022</u>	



DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	
LEMBAR PENGAJUAN.....	ii
LEMBAR PENGESAHAN.....	iii
LEMBAR PERNYATAAN KEASLIAN PENELITIAN.....	iv
UCAPAN TERIMA KASIH.....	v
ABSTRAK INDONESIA DALAM BAHASA INDONESIA.....	vii
ABSTRAK DALAM BAHASA INGGRIS.....	viii
DAFTAR ISI	ix
DAFTAR GAMBAR	xi
DAFTAR TABEL	xii
DAFTAR ARTI SINGKATAN	xiv
BAB I	PENDAHULUAN
I.1 Latar Belakang	1
I.2 Rumusan Masalah	3
I.3 Tujuan Penelitian	3
I.4 Manfaat Penelitian	4
I.5 Ruang Lingkup	4
I.6 Organisasi /Sistematika	5
BAB II	TINJAUAN PUSTAKA
II.1 Penuaan (<i>Aging</i>).....	6
II.2 Radikal Bebas (<i>Reactive Oxygen Species/ROS</i>).....	7
II.3 8-OHdG.....	10

	II.4 Hipertensi.....	13
	II.5 Kerangka Teori.....	16
	II.6 Kerangka Konsep.....	17
	II.7 Hipotesis.....	17
	II.8 Definisi Operasional.....	18
BAB III	METODE PENELITIAN	
	III.A Rancangan Penelitian	19
	III.B Lokasi dan Waktu Penelitian.....	20
	III.C Populasi dan Sampel Penelitian	20
	III.D Perkiraan Besar Sampel	21
	III.E Instrument Penelitian.....	22
	III.F Izin Penelitian dan Kelayakan Etik	26
	III.G Alur Penelitian.....	27
	III.H Teknik Pengumpulan Data.....	28
	III.I Analisis Data.....	
BAB IV.	HASIL DAN PEMBAHASAN	
	A. Hasil.....	31
	B. Pembahasan.....	40
BAB V.	PENUTUP	
	A. Kesimpulan.....	47
	B. Saran.....	47
	DAFTAR PUSTAKA.....	48
	LAMPIRAN.....	50

DAFTAR GAMBAR

GAMBAR	KETERANGAN
1	Ketidakstabilan genom dan gesekan telomere
2	Konsekuensi dari kerusakan asam nukleat yang diinduksi ROS
3	Produksi ROS dan Kapasitas Anti-Oksidan Sel
4	Reaksi guanosis hidrosilasi mengalami perubahan menjadi 8-OHdG akibat adanya ROS
5	Mekanisme terjadinya hipertensi karena proses penuaan yang menyebabkan disfungsi endotel.
6	Kerangka Teori
7	Kerangka konsep
8	Rancangan Penelitian
9	Alur Penelitian
10	Perbedaan kadar 8-OHdG urin pada penderita hipertensi dan kontrol sehat laki-laki dan perempuan
11	Perbedaan kadar 8-OHdG urin pada penderita hipertensi dan kontrol sehat umur 46-50 tahun dan umur 51-55 tahun.
12	Perbedaan kadar 8-OHdG urin pada penderita hipertensi yang meminum obat teratur dan tidak teratur
13	Perbedaan kadar OHdG urin pada penderita hipertensi dan kontrol sehat

DAFTAR TABEL

No.	KETERANGAN
1	Kategori usia menurut Depkes RI 2009
2	Klasifikasi Hipertensi menurut JNC VII
3	Defenisi operasional
4	Karakteristik responden
5	Perbedaan kadar 8-OHdG urin berdasarkan jenis kelamin pada Hipertensi
6a	Perbedaan kadar 8-OHdG Urin berdasarkan jenis kelamin pada kontrol sehat
6b	Perbedaan kadar 8-OHdG urin pada Kelompok Hipertensi dengan kontrol sehat berdasarkan jenis kelamin perempuan
6c	Perbedaan kadar 8-OHdG urin pada kelompok Hipertensi dengan Kontrol sehat berdasarkan jenis kelamin laki-laki
6d	Perbedaan kadar 8-OHdG urin pada usia 46-50 tahun dengan 51-55 tahun berdasarkan jenis kelamin perempuan
6e	Perbedaan kadar 8-OHdG urin pada usia 46-50 tahun dengan 51-55 tahun berdasarkan jenis kelamin laki-laki
7a	Perbedaan kadar 8-OHdG urin berdasarkan umur pada Hipertensi
7b	Perbedaan kadar 8-OHdG urin berdasarkan umur pada kontrol sehat
8	Perbedaan kadar 8-OHdG urin berdasarkan keteraturan minum obat pada Hipertensi
9	Perbedaan kadar 8-OHdG urin berdasarkan lama sakit Hipertensi

10	Perbedaan kadar 8-OHdG urin berdasarkan kelompok Hipertensi dan kontrol sehat
----	---

DAFTAR ARTI SINGKATAN

SINGKATAN	ARTI
8-oxodGsn	8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine
8-oxoGsn	8-oxo-7, 8-dihydroguanosine
DNA	Deoxyribonucleic Acid
RNA	Ribonucleic acid
$\cdot\text{OH}$	Hidroksil Peroksida
O_2^-	Anion Superoksida
NO^-	Nitric Oxide
ELIZA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
ROS	Reactive Oxygen Species
Redoks	Reaksi Oksidasi
SOD	Superoksida Dismutase
OH^\cdot	Radikal Hidroksil
H_2O_2	Hidrogen Peroksida
$^1\text{O}_2$	Oksigen Singlet Berenergi Tinggi
eNOS	Endothelial Nitric Oxide Synthase
BH_4	Tetrahydrobiopterin
NADPH	Nicotinamideadenine dinucleotide phosphate
EPC	Endothelial Pregnitor Cell

BAB I

PENDAHULUAN

I.1 Latar Belakang

Proses penuaan ditandai dengan hilangnya integritas fisiologis secara progresif, mengarah pada gangguan fungsi serta peningkatan resiko terhadap kematian. Terjadinya transisi epidemiologi, demografi dan teknologi, mengakibatkan perubahan dari pola penyakit infeksi ke Penyakit Tidak Menular (PTM), seperti tekanan darah tinggi (hipertensi). WHO memperkirakan, tahun 2020 PTM akan menyebabkan 73% kematian dan 60% kesakitan di seluruh dunia (Otin et al, 2013, Rahajeng, E, et al, 2009).

Berdasarkan *Join National Committee dalam The Eighth Report of Join National Committee on Prevention, Detection, Evaluation and Treatment of High Blood Pressure*, hipertensi ditandai dengan tekanan darah ≥ 140 mmHg (sistolik) dan/atau ≥ 90 mmHg, dan menjadi salah satu penyebab utama kematian di dunia. WHO mengestimasi, prevalensi hipertensi secara global 22% dari total penduduk dunia, hanya kurang dari seperlima yang melakukan upaya pengendalian terhadap hipertensi. Prevalensi hipertensi tertinggi yaitu Wilayah Afrika (27%) dan Asia Tenggara menduduki posisi ke-3 tertinggi (25%). WHO memprediksi, 1 di antara 5 orang perempuan di dunia menderita hipertensi, lebih banyak dibandingkan laki-laki. Dalam *Global Status Report On Non-Communicable Disease*, prevalensi hipertensi (2014) pada dewasa usia 18 tahun keatas (22%), mengakibatkan kematian 40% karena penyakit jantung dan stroke sebanyak 51%. Hipertensi banyak di derita masyarakat Indonesia (57,6%). Berdasarkan data yang diperoleh dari dinas kesehatan kota Makassar (2016), hipertensi berada pada urutan nomor 2 dari 10 penyakit terbanyak, prevalensinya 27,61%, dan mortalitasnya 18,6% (Ansar J et al, 2019, Sugihantono, A, 2018).

Hipertensi banyak diderita lansia, prevalensinya meningkat seiring bertambahnya usia, menyebabkan penyakit kardiovaskular yang fatal sebagai pembunuh diam-diam. Pada hipertensi terjadi proses penuaan akibat perubahan struktur dan fungsi vaskular, khususnya fungsi endotel, disebabkan produksi berlebihan spesies oksigen reaktif (ROS) yang menyebabkan stres oksidatif (Higashi Y et al, 2012)

Salah satu biomarker penanda stres oksidatif adalah *8-Hidroxy-deoxyguanosine* (8-OHdG), merupakan komponen penting kerusakan gen yang dihasilkan secara endogen dan eksogen yang melibatkan proses oksidatif. 8-OHdG adalah produk dari kerusakan oksidatif DNA (penanda kerusakan oksidatif) akibat stres oksidatif, seperti yang terukur dalam urin, yang bersifat non-invasif, dan juga sangat stabil (ESCULA, 2010). Pada penelitian sebelumnya, kadar 8-OHdG pada subyek hipertensi secara signifikan lebih tinggi dibandingkan pada kontrol sehat, sehingga dapat digunakan sebagai penanda stres oksidatif (Lleti et al, 2012).

Sampel yang digunakan pada penelitian iniu berdasarkan kategori Depkes RI tahun 2009.

Tabel 1 .Kategori Usia Menurut Depkes RI (2009)

No.	Kategori	Usia
1.	Masa Balita	0-5 tahun
2.	Masa kanak-kanak	5-11 tahun
3.	Masa remaja awal	12-16 tahun
4.	Masa remaja akhir	17-25 tahun
5.	Masa dewasa awal	26-35 tahun
6.	Masa dewasa akhir	36-45 tahun
7.	Masa lansia awal	46-55 tahun
8.	Masa lansia akhir	56-65 tahun
9.	Masa Manual	65 tahun ke atas

I.2 Rumusan Masalah

Apakah kadar *8-Hidroxy-deoxyguanosine* (8-OHdG) urin berpotensi sebagai biomarker stres oksidasi pada penderita hipertensi lansia awal?

I.3 Tujuan Penelitian

Penelitian ini dilakukan dengan tujuan untuk :

Tujuan Umum:

Mendeteksi kadar *8-Hidroxy-deoxyguanosine* (8-OHdG) urin sebagai biomarker kerusakan oksidatif pada lansia awal dengan hipertensi .

Tujuan Khusus

1. Mengetahui kadar *8-Hydroxy-deoxyguanosine* (8-OHdG) urin pada lansia awal dengan hipertensi.
2. Mengetahui kadar *8-Hydroxy-deoxyguanosine* (8-OHdG) urin lansia awal sehat.
3. Membandingkan kadar *8-Hydroxy-deoxyguanosine* (8-OHdG) urin pada lansia awal dengan hipertensi dan kontrol sehat.
4. Membandingkan kadar *8-Hydroxy-deoxyguanosine* (8-OHdG) urin pada lansia awal dengan hipertensi dan kontrol sehat menurut jenis kelamin.
5. Membandingkan kadar *8-Hydroxy-deoxyguanosine* (8-OHdG) urin pada lansia awal dengan hipertensi dan kontrol sehat menurut umur.
6. Membandingkan kadar *8-Hidroxy-deoxyguanosine* (8-OHdG) urin pada lansia awal dengan hipertensi berdasarkan keteraturan minum obat.

I.4 Manfaat Penelitian

Penelitian ini dilakukan dengan harapan :

- a. Meningkatkan wawasan ilmu pengetahuan dan menjadi bahan literasi tentang kadar *8-Hydroxy-deoxyguanosine* (8-OHdG) urin pada lansia awal dengan hipertensi.
- b. Mengetahui hubungan *8-Hydroxy-deoxyguanosine* (8-OHdG) urin dengan proses kerusakan oksidatif lansia awal dengan hipertensi.
- c. Digunakan sebagai acuan untuk penelitian selanjutnya.

I.5. Ruang Lingkup Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian deskriptif. Melalui proses pengumpulan serta pengolahan data yang dapat menggambarkan perbedaan antara populasi lansia awal dan non hipertensi dengan menggunakan *8-Hidroxy-deoxyguanosine* (8-OHdG) urin sebagai biomarker penuaan.

Oleh karena itu, penelitian ini dibatasi oleh hal-hal berikut :

1. Penelitian dilakukan pada populasi lansia awal dengan hipertensi dan non hipertensi. Penelitian ini memakai sampel urin, yang diperoleh dari lokasi penelitian (puskesmas Kaluku Bodoa dan puskesmas Mangasa) di kota Makassar.
2. Hasil penelitian yang didapat, selanjutnya untuk dapat menilai apakah kadar 8-OHdG dapat dipertimbangkan sebagai biomarker stress oksidatif.

I.6 Organisasi/Sistematika Penelitian

Penelitian secara garis besar ditulis mengikuti Pedoman Penulisan Tesis dan Disertasi Edisi 5 Universitas Hasanuddin 2021 yang diuraikan sebagai berikut :

1. Dimulai dari bab pendahuluan yang terdiri atas latar belakang masalah, rumusan masalah, tujuan penelitian, manfaat penelitian, dan ruang lingkup penelitian.
2. Selanjutnya bab tinjauan pustaka yang berisi uraian secara sistematis mengenai landasan teori, pemikiran, serta hasil penelitian sebelumnya yang berhubungan dengan penelitian ini. Hasilnya lalu dituangkan ke dalam kerangka teori, kerangka konsep, dan hipotesis.
3. Terakhir bab metode penelitian yang berisi rancangan penelitian, waktu dan lokasi penelitian, bahan dan alat, populasi dan sampel, teknik pengumpulan data, definisi operasional, serta analisis data.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

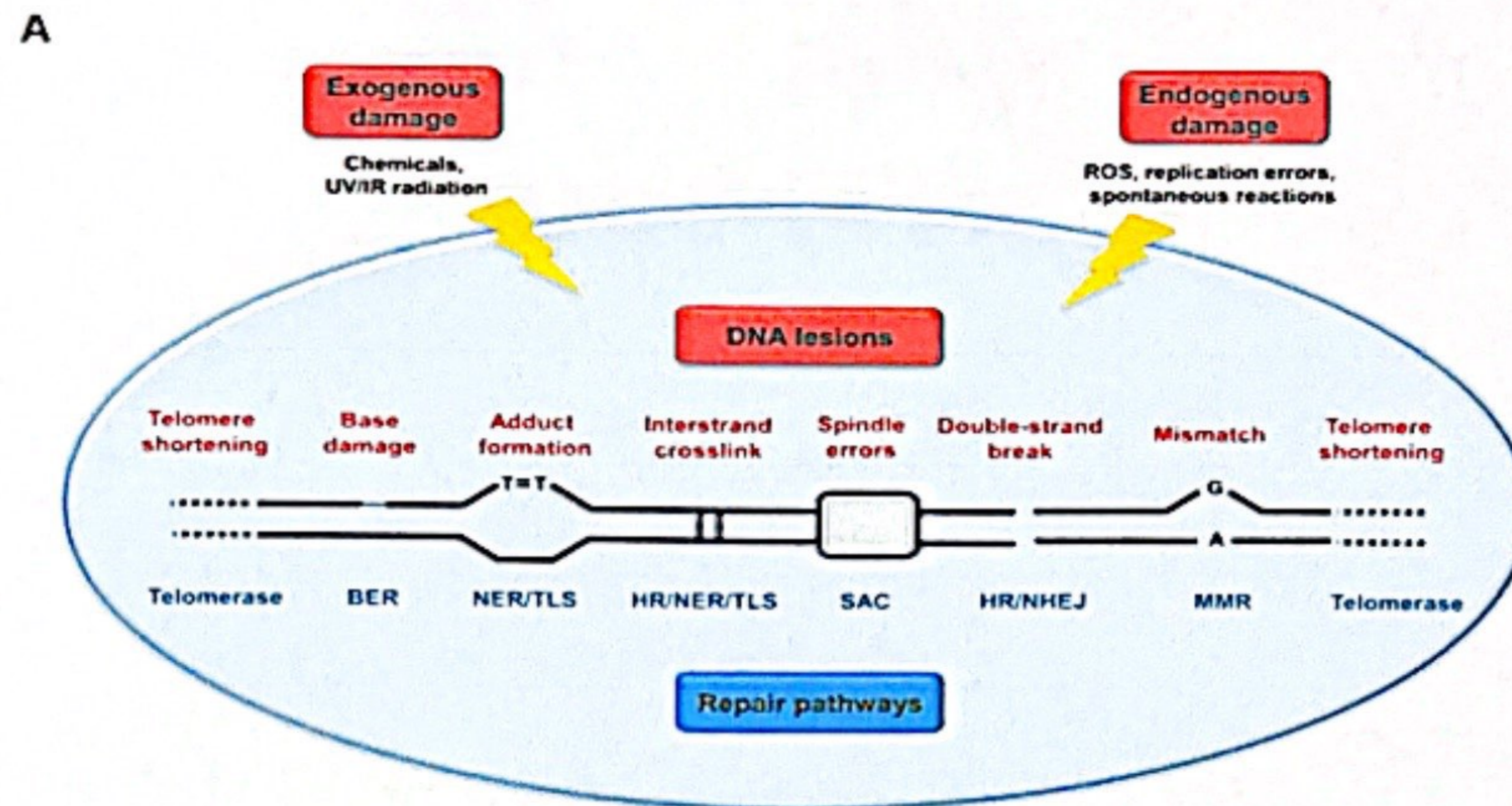
II.1 Penuaan (*Aging*)

Sebagian besar ahli biologi evolusi mendefinisikan penuaan sebagai penurunan kemampuan fungsi intrinsik yang bergantung pada usia atau progresif usia, dimana mengarah pada peningkatan resiko angka kematian spesifik usia (misalnya penurunan tingkat kelangsungan hidup) dan penurunan tingkat reproduksi khusus usia (Flatt, 2012).

Penuaan dikondisikan sebagai suatu penyakit, yang dapat "dimanipulasi, diobati, dan dicegah, bahkan ditunda" (Spratt, 2010), oleh karena itu, mengidentifikasi tahap yang tepat dari proses penuaan akan sangat bermanfaat. Penanda penuaan yang baik harus dengan mencerminkan keadaan penuaan, dan tidak dipengaruhi oleh faktor lain (Simm and Johnson, 2010), karena proses penuaan itu sendiri merupakan faktor risiko untuk banyak penyakit (Andreoli et al, 2011).

Hallmarks of Aging yang menjabarkan sembilan mekanisme biologis proses penuaan, ketidakstabilan genom, perubahan epigenetik, terjadinya gesekan telomer, hilangnya proteostasis, deregulasi penginderaan hara, terjadinya disfungsi mitokondria, penuaan seluler, kelelahan sel punca, serta perubahan komunikasi interseluler (Otin et al, 2013).

Pada penuaan, selain radikal bebas seperti *Reactive Oxygen Species* (ROS), faktor genetik juga berperan dalam terjadinya proses penuaan. Dampak kerusakan DNA eksogen pada telomer mengakibatkan terjadinya kerusakan DNA tipe persisten yang memberi dampak pada efek seluler yang merusak termasuk penuaan (Fumagalli et al., 2012, Hewitt et al., 2012).



Gambar 1. Ketidakstabilan genom dan gesekan telomere (Otin et al, 2013)

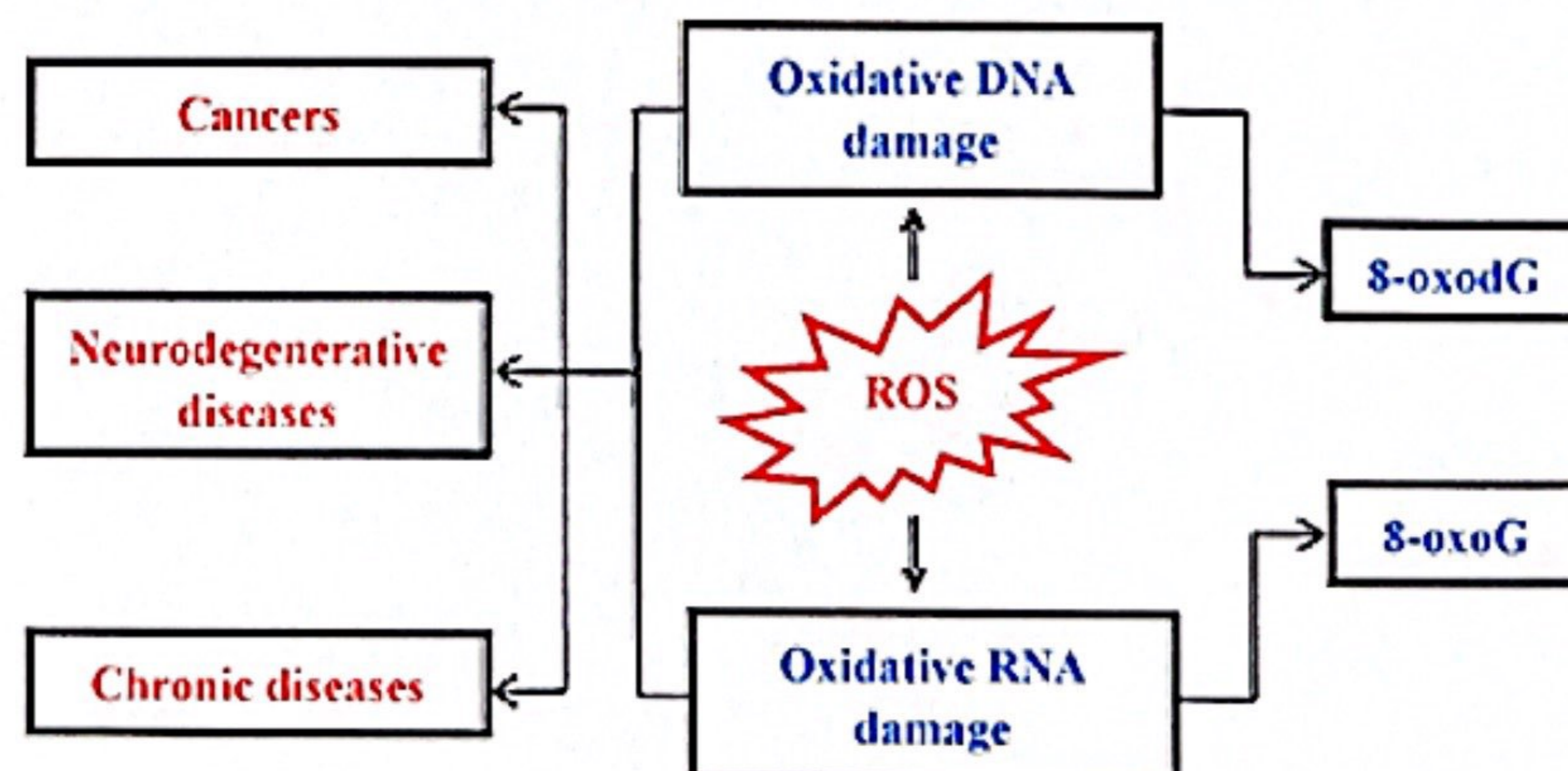
II.2 Reactive Oxygen Species (ROS)

Spesies oksigen reaktif (*Reactive Oxygen Species/ROS*) sangat berperan dalam proses penuaan (Ristow dan Schmeisser, 2011). Seiring bertambahnya usia kronologis, ROS akan meningkat dalam tubuh (Hekimi et al., 2011). Radikal Hidroksida (OH^\cdot), anion superoksida (O_2^\cdot), hidrogen peroksida (H_2O_2) dan oksigen singlet ($^1\text{O}_2$) sebagai ROS yang dapat menimbulkan kerusakan oksidatif pada makromolekul seluler, termasuk lipid, protein dan asam nukleat (Guo et al, 2017). ROS dapat diproduksi oleh beberapa sumber endogen dan eksogen, termasuk proses metabolisme, polusi udara, paparan radiasi matahari dan radiasi pengion, gaya hidup, merokok, konsumsi alkohol dan pola makan yang buruk, obat-obatan, dan beberapa pekerjaan (Prasad et al, 2017).

Generasi dan akumulasi ROS dapat menyebabkan kerusakan oksidatif pada DNA yang pada gilirannya dapat menyebabkan patologi terkait DNA/protein. Dengan demikian, signifikansi biologis dari perubahan kadar 8-OHdG telah dipelajari dalam berbagai macam penyakit (Korkmazl et al, 2018).

ROS endogen memiliki efek pengaturan penting dalam jalur transduksi sinyal dalam tubuh. Menjaga keseimbangan antara pembersihan dan pembentukan ROS memainkan peran penting dalam tubuh. Dalam keadaan istirahat, sistem antioksidan tubuh mempertahankan keseimbangan redoks yang dapat menghilangkan radikal bebas berlebih tepat waktu. Sistem antioksidan termasuk antioksidan sederhana seperti vitamin C dan E, dapat mencegah radikal bebas dan mencegah kerusakan biomolekul seluler. Sistem antioksidan lainnya adalah sistem enzimatis termasuk superoksida dismutase (SOD), katalase, glutathione peroksidase dan lainnya. Semua sistem ini memiliki kemampuan yang berbeda untuk membatasi konsentrasi akumulasi ROS yang tidak biasa. Ketika tubuh dalam keadaan patologis atau terpapar faktor-faktor eksogen berbahaya lainnya, peningkatan ROS yang terakumulasi *in vivo*, jika tidak dihilangkan tepat waktu, akan menyebabkan ketidakseimbangan redoks. Sifat reaktif ini dapat menyebabkan kerusakan oksidatif yang luas pada asam nukleat, lipid, dan struktur seluler penting lainnya, yang menyebabkan disfungsi sel, gangguan metabolisme, atau bahkan mutasi, yang menyebabkan banyak penyakit (Guo et al, 2017).

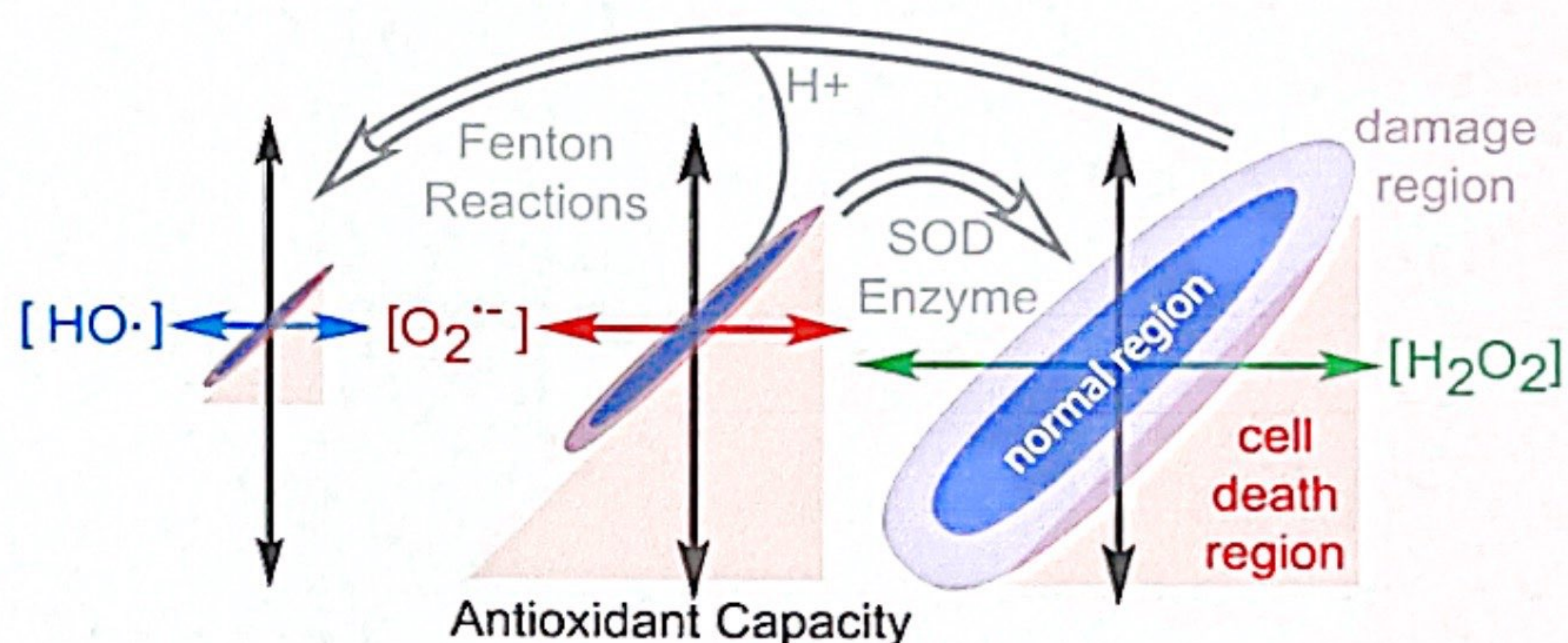
Kerusakan oksidatif terhadap asam nukleat dapat menyebabkan substitusi basa, penambahan, penghapusan, dan mutasi lainnya. Selama proses kerusakan oksidatif, banyak produk oksidasi asam nukleat dihasilkan. 8-OHdG merupakan salah satu pengubah oksidatif yang diinduksi oleh ROS di antara berbagai jenis produk oksidatif (Fleming et al, 2015)



Gambar 2. Konsekuensi dari kerusakan asam nukleat yang diinduksi ROS

(Guo et al, 2017)

Guanin mempunyai potensi oksidasi yang terendah di antara basis DNA, residu guanin dari asam nukleat yang paling mudah mengalami oksidasi oleh radikal hidroksil (OH^\bullet) dan oksigen singlet berenergi tinggi ($^1\text{O}_2$) (Z.Radak et al, 2010, Singh A et al, 2019). Salah satu karakteristik penting dari penuaan adalah akumulasi protein disfungsional sehingga dapat menyebabkan kerusakan sel atau bahkan kematian sel (Gan Wei et al, 2018).



Gambar 3. Produksi ROS dan Kapasitas Anti-Oksidan Sel

(F. Shafnaz et al, 2019)

Radikal hidroksil, sebagai salah satu spesies oksigen reaktif yang paling penting, memainkan peran penting dalam reaksi stres yang menyebabkan kerusakan asam nukleat dan biomolekul lainnya. Ini dapat dihasilkan oleh mekanisme yang berbeda, misalnya, bagian hidroksil peroksida yang tidak terdekomposisi berubah menjadi radikal hidroksil melalui reaksi Fenton ($\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{OH}^- + \text{OH}^\bullet$) (Guo et al, 2019; Singh A et al, 2019). Jika akumulasi ROS tidak diambil secara tepat, keseimbangan redoks akan terputus, yang mengakibatkan disfungsi detoksifikasi biologis seluler dan mekanisme perbaikan (Menon et al, 2014).

II.3 8-Hidroxy-deoxyguanosine (8-OHdG)

8-Hidroxy-deoxyguanosine (8-OHdG) diproduksi oleh kerusakan oksidatif DNA (Gambar 1) oleh oksigen reaktif dan spesies nitrogen dan berfungsi sebagai penanda stres oksidatif. Hidroksilasi guanosisin terjadi sebagai respons terhadap baik proses metabolisme normal dan berbagai faktor lingkungan. Terjadinya peningkatan kadar 8-OHdG mempunyai kaitan dengan terjadinya proses penuaan serta dengan sejumlah kondisi patologis termasuk kanker, diabetes, dan hipertensi (ELISA, 2016).

Pada rentang usia pertengahan dan lebih tua, insiden terjadinya hipertensi pada wanita akan meningkat. Hal ini berhubungan dengan masa menopause, dimana kadar hormon estrogen akan mengalami penurunan. Perubahan kadar hormon estrogen menyebabkan perempuan mengalami peningkatan sensitivitas terhadap garam serta penambahan berat badan. Kedua hal tersebut berpotensi memicu kenaikan tekanan darah (Dalyoko, 2011). Berdasarkan hasil penelitian Raharjo (2013) di Puskesmas Penumping, Surakarta, pada kelompok wanita pasca menopause diketahui bahwa proporsi penyakit hipertensi yang memiliki hubungan dengan usia pasca menopause (Saputri, A dan Rahayu, S.R, 2017). Pada kondisi umur lansia, juga terjadi proses *aging* yang terjadi ditandai dengan menurunnya hormon estrogen seiring dengan bertambahnya umur pada perempuan yang memasuki usia tua (menopause) sehingga kadar 8-OHdG urin pada perempuan akan menjadi lebih tinggi (Kusumawati, dkk, 2016).

Perempuan umumnya mempunyai tekanan darah yang lebih tinggi saat masuk di masa menopause. Pada perempuan yang belum mengalami menopause dilindungi oleh hormon estrogen yang memiliki peran dalam meningkatkan *High Density Lipoprotein* (HDL) yang mana HDL merupakan faktor pelindung yang dapat mencegah terjadinya proses aterosklerosis. Estrogen sangat berperan dalam proses imunitas pada perempuan usia premenopause. Perempuan yang premenopause akan mengalami penurunan kadar hormon estrogen yang selama ini punya peran untuk melindungi

pembuluh darah dari kerusakan. Bilamana hal ini terus berlanjut dimana hormon estrogen tersebut berubah kuantitasnya sesuai dengan umur perempuan secara alami, yang umumnya mulai terjadi pada perempuan rentang umur 45-55 tahun sebelum lanjut usia (lansia). Faktor resiko hipertensi lebih besar terjadi pada perempuan yang berumur tua. Hal ini sesuai dengan pendapat (Yuliarti 2007), yang menyatakan bahwa terdapat korelasi yang signifikan antara jenis kelamin dengan hipertensi. Hal tersebut menunjukkan bahwa hipertensi pada perempuan ikut dipengaruhi oleh kadar hormon estrogen. Pada kondisi ini, proses *aging* yang terjadi ditandai dengan menurunnya hormon estrogen seiring dengan bertambahnya umur pada perempuan yang memasuki usia tua (menopause) sehingga perempuan menjadi lebih rentan terhadap hipertensi, dan kadar 8-OHdG urin juga didapatkan lebih tinggi pada perempuan dibandingkan kadar 8-OH-dG pada laki-laki. (Kusumawati, dkk, 2016).

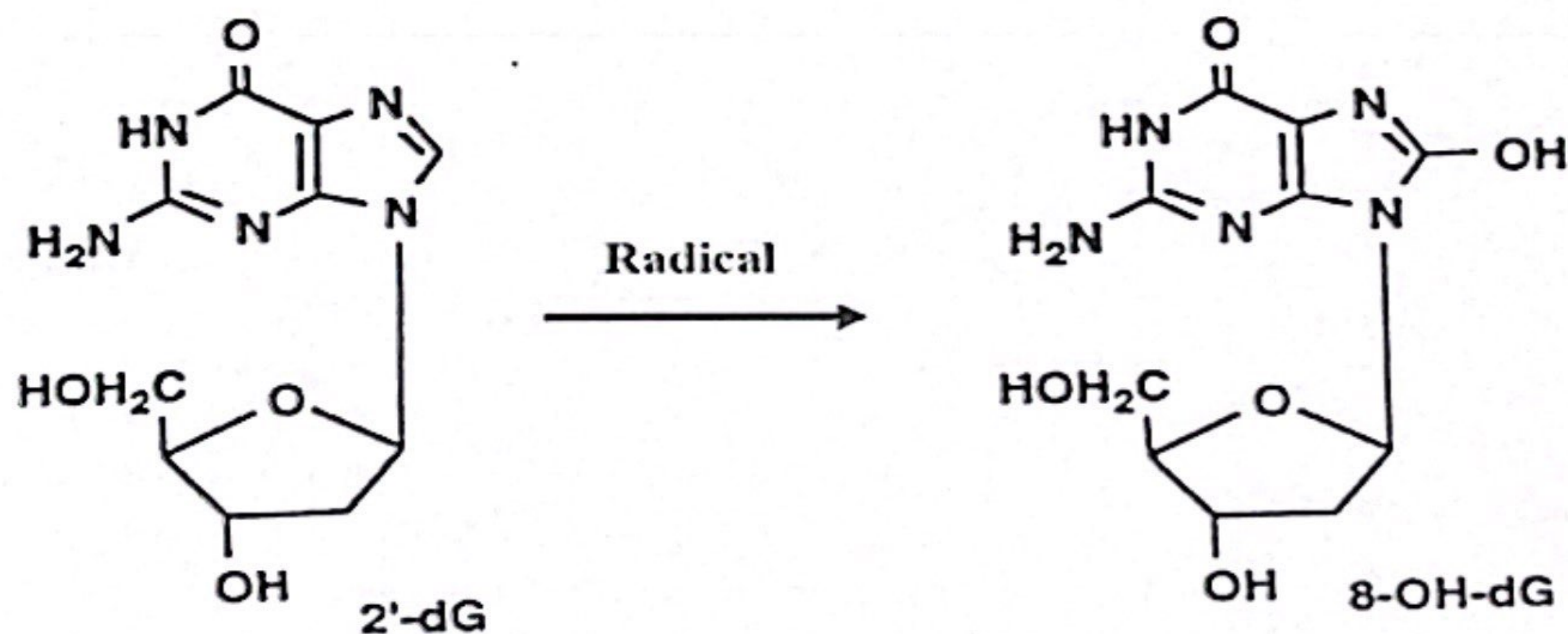
Salah satu yang paling diinduksi produk sampingan ROS adalah oksidasi dari kedua nuklir (nDNA) dan DNA mitokondria (mtDNA). Yang paling rawan oksidasi di antara semua purin dan pirimidin basa adalah guanin. Setelah oksidasi, hidroksil kelompok ditambahkan ke posisi C8 guanin molekul, menghasilkan produk sampingan oksidatif 8-OHdG, yaitu dianggap sebagai biomarker penting dari stres oksidatif seluler umum dan produk perbaikan. Selain itu, karena potensi mutageniknya, 8-OHdG menciptakan ketidakstabilan genetik yang nyata dalam struktur DNA (Espinosa et al,2007).

Sebelumnya pernah dilakukan penelitian ini dimana kuantifikasi konsentrasi urin 8-OHdG digunakan untuk menyatakan status oksidasi subyek hipertensi. 8-OHdG telah secara bersamaan diisolasi dan diuji dalam nuklir (nDNA) dan DNA mitokondria (mtDNA). Selain itu, stres oksidatif sel mononuklear telah diperkirakan dengan menggunakan tingkat GSH dan GSSG dan rasio GSSG/GSH pada subjek hipertensi sebelum dan setelah pengobatan antihipertensi. Dalam penelitian tersebut menunjukkan bahwa stres oksidatif berkurang secara signifikan pada pasien hipertensi setelah perawatan efeknya disertai dengan penurunan tekanan darah mereka.

Sebuah korelasi signifikan diamati membandingkan hasil urin 8-OHdG dan yang diisolasi dari DNA mitokondria. Selain itu, ekskresi urin 8-OHdG juga berkorelasi dengan rasio sel GSSG/GSH. Penelitian tersebut menyimpulkan bahwa pemeriksaan urin 8-OHdG merupakan penanda stres oksidatif pada hipertensi (Espinosa et al, 2007).

Guanosin yang mengalami oksidasi akan berubah menjadi *8-Hydroxy-deoxy-Guanosine* atau disebut juga *8-Hydroxy-2-deoxy-Guanosine* (8-OHdG). Deoksiguanosin (dG) merupakan salah satu basa yang menyusun DNA dan bilamana terjadi reaksi oksidasi, dimana radikal hidroksil (OH•) yang terbentuk dapat menyerang posisi carbon-8 (C-8) basa guanin pada DNA sehingga menghasilkan DNA adduct atau radikal *adduct* C8-OH yang akan menjadi *8-Hidroksi-2'-deoksiguanosin* (8-OHdG) (Guo, et al., 2017, Parwata., 2016).

Proses perbaikan pada DNA yang rusak melalui proses *Base Excision Repair* yang dapat mengeksresikan DNA rusak yang terpotong. DNA yang rusak menghasilkan 8-OHdG yang masuk dalam aliran darah melewati aksi glikosilasi DNA enzim perbaikan yang kemudian dieksresikan di dalam urin (Fenga, et al., 2017, Parwata., 2016).



Gambar 4. Reaksi guanosin hidroksilasi mengalami menjadi 8-OHdG akibat adanya proses ROS (Parwata., 2016).

Dalam kondisi fisiologis, ROS diambil oleh sistem antioksidan, tetapi ketika konsentrasinya terlalu tinggi, kerusakan oksidatif pada protein, lipid, dan DNA terjadi. Kerusakan DNA biasanya diperbaiki oleh sistem spesifik dan produk teroksidasi diekskresikan dalam urin tanpa metabolisme lebih lanjut. Peningkatan kadar urin dari metabolit teroksidasi dikaitkan dengan peningkatan risiko beberapa kondisi patologis. Salah satu metabolit yang paling banyak dipelajari adalah 8-OHdG, yang dianggap sebagai biomarker stres oksidatif DNA karena guanosine adalah yang paling teroksidasi di antara nukleobase DNA (Alessandro et al, 2016).

II.4. Hipertensi

Definisi hipertensi adalah tekanan darah sistolik ≥ 140 mmHg dan/atau tekanan darah diastolik ≥ 90 mmHg. *The joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and treatment of High Bloodpressure (JNC VII)* dan *WHO/International Society of Hypertension guidelines subcommittees* menyetujui bahwa TDS dan keduanya dapat digunakan untuk klasifikasi hipertensi. Definisi hipertensi menurut WHO dapat dilihat pada tabel 2.

Hipertensi merupakan salah satu PTM. Faktor risiko PTM, diantaranya kurangnya aktivitas fisik, asupan tinggi lemak dan kalori, merokok, serta konsumsi alkohol (Rahajeng, E, et al, 2009).

Penurunan fungsi terkait usia merupakan fenomena fisiologis yang terjadi di semua sistem organ. Prosesnya ini dapat diamati pada patologi kardiovaskular, termasuk hipertensi. Dalam sistem vaskular, ini ditandai dengan patologis progresif, remodeling disertai pengerasan, biasanya terkait dengan perubahan matriks ekstraseluler (ECM) pada kolagen dan elastin. Hal ini Sebagian tergantung pada penuaan seluler dan berhentinya proses pertumbuhan. Meskipun hipertensi dan aterosklerosis berhubungan dengan akumulasi penanda penuaan seluler di vaskular. Kondisi ini sering dikaitkan dengan disfungsi vaskular daripada hilangnya kapasitas proliferative, misalnya faktor risiko penyakit kardiovaskular, seperti hipertensi, merokok,

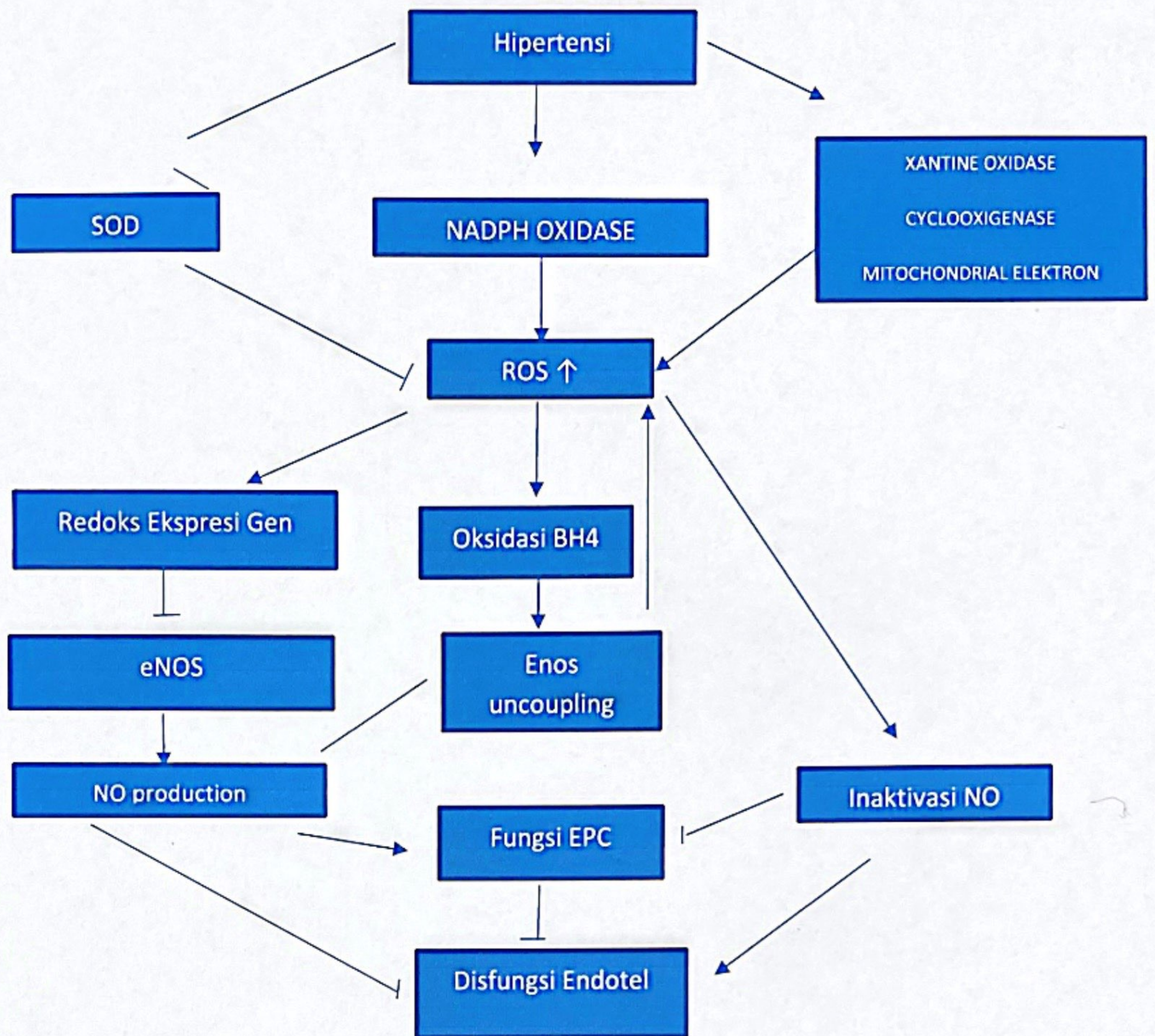
hiperlipidemia, atau diabetes mellitus terkait dengan mengalami penurunan fungsi vaskular lebih cepat. Itulah mengapa penentuan usia vaskular menjadi kunci penting pedoman klinis untuk pencegahan kardiovaskular, untuk menunjukkan pasien bagaimana gaya hidup mereka berkontribusi pada percepatan kerusakan fungsi vascular. Stres oksidatif dan peradangan, merupakan mekanisme kunci disfungsi endotel dan kerusakan arteri, berhubungan dengan faktor risiko penyakit vaskular, kekakuan arteri, dan penuaan. Ini mendasari makro dan mikroangiopati, disfungsi ginjal, iskemia jantung, dan penurunan kognitif (Guzik et al, 2017)

Sejumlah faktor meningkatkan tekanan darah termasuk (1) obesitas, (2) konsumsi alkohol yang tinggi, (3) resistensi insulin (4) konsumsi tinggi garam (pada pasien sensitif terhadap kadar garam), (5) penuaan dan mungkin (6) menetap. gaya hidup, (7) stres, (8) rendahnya asupan kalium, dan (9) rendahnya asupan kalsium. Selain itu, banyak dari faktor ini bersifat aditif, seperti asupan alcohol dan obesitas (Carretero et al, 2000).

Penuaan dikaitkan dengan disfungsi endotel, mungkin karena penurunan jalur NO dan prostanoid, namun hipertensi pada lansia sebagian besar merupakan kelainan sistolik, dianggap terutama karena perubahan kekakuan arteri besar (James et al, 2006).

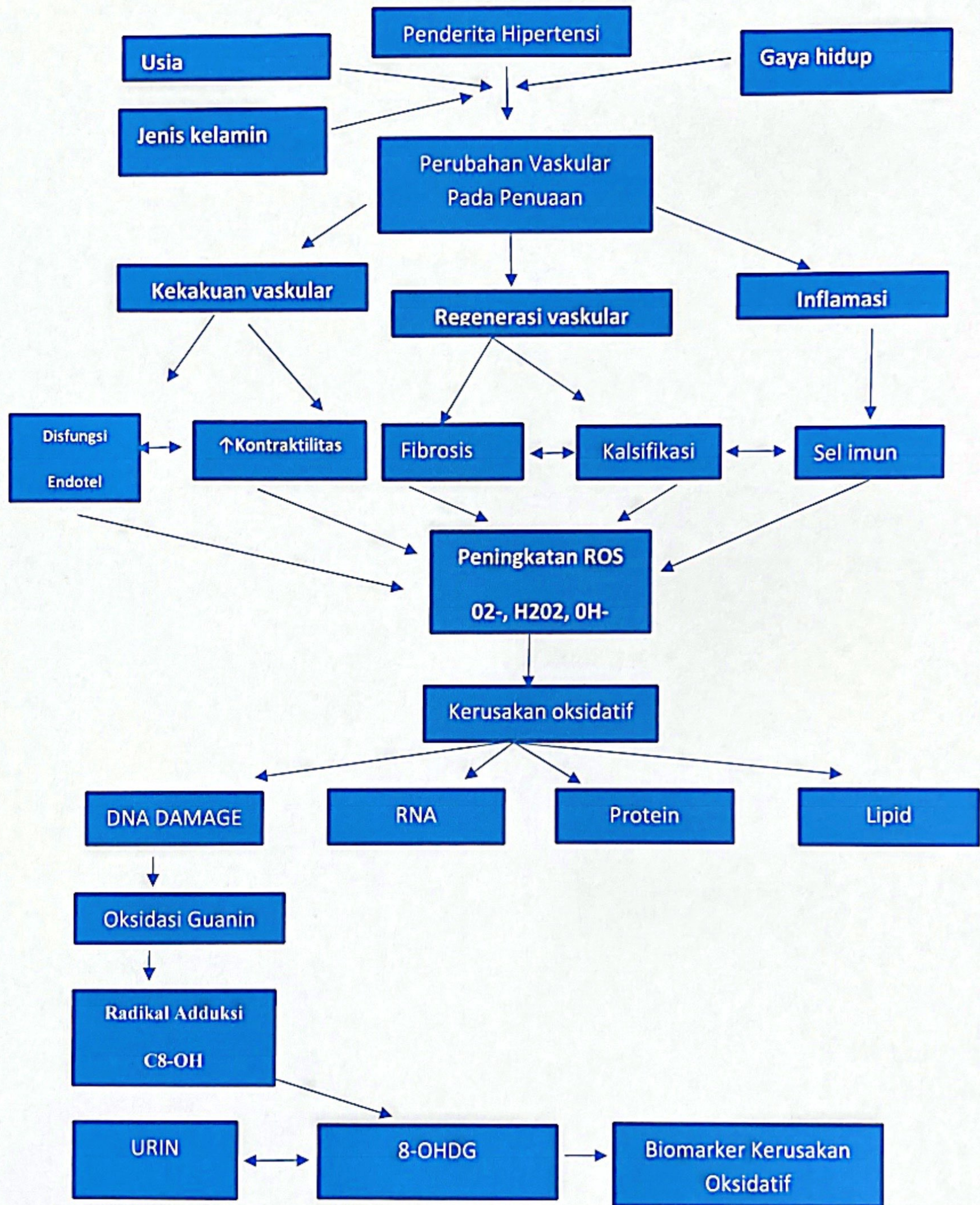
Tabel 2. Klasifikasi hipertensi dari JNC VII

Klasifikasi Tekanan Darah	Sistolik (mmHg)	Diastolik (mmHg)
Normal	<120	<80
Prehipertensi	120–139	80–89
Hipertensi Stage 1	140–159	90–99
Hipertensi Stage 2	160 atau >160	100 atau >100



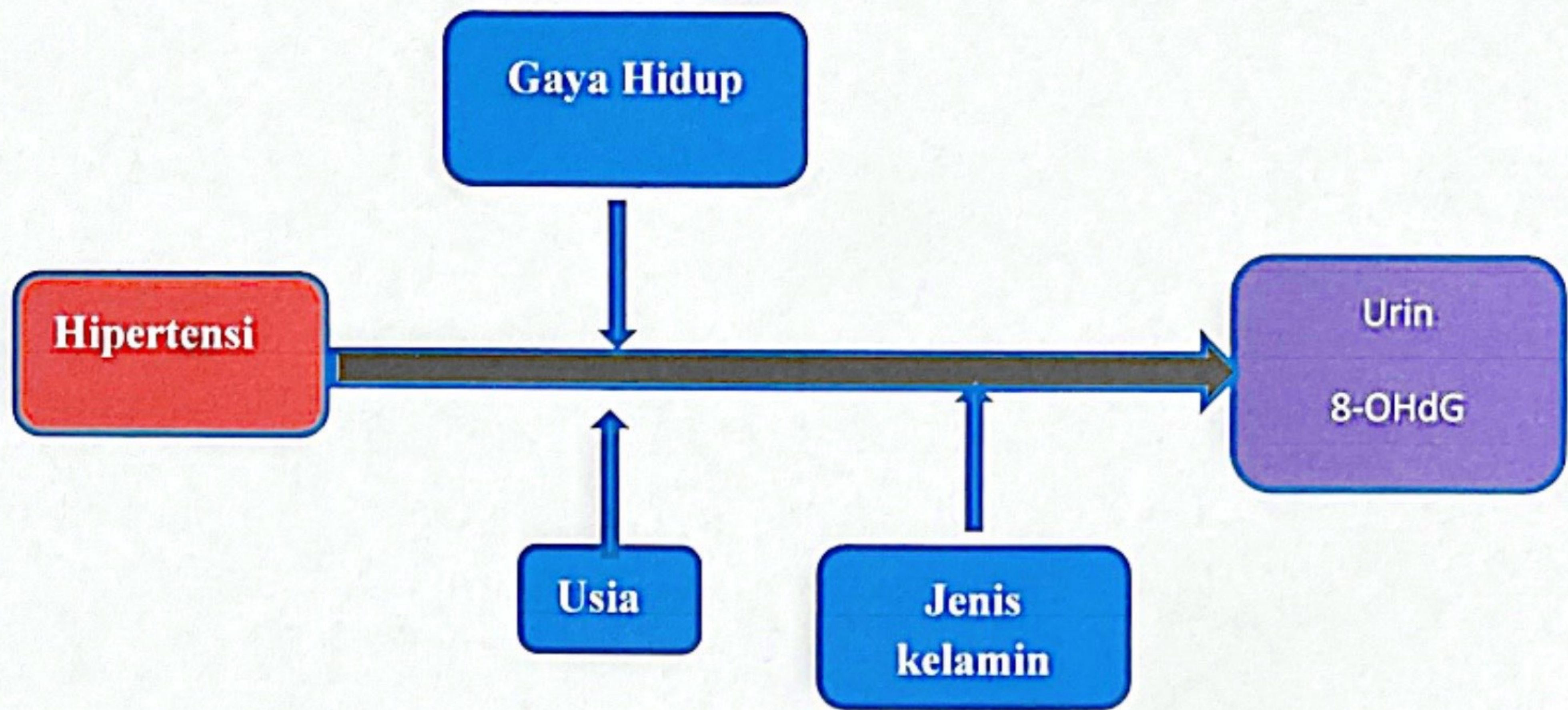
Gambar 5. Mekanisme terjadinya hipertensi karena proses penuaan yang menyebabkan disfungsi endotel

II.5. Kerangka Teori.

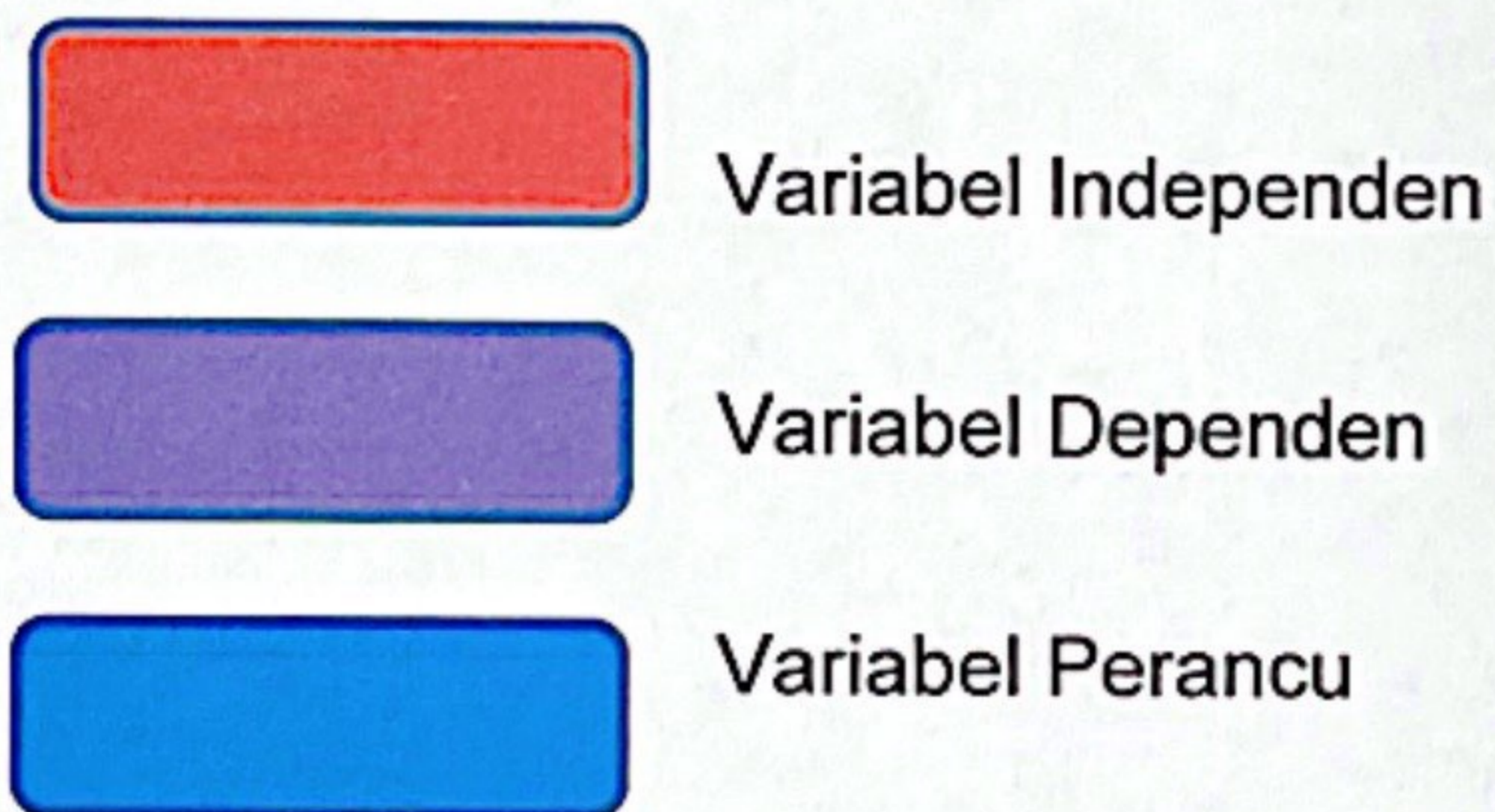


Gambar 6. Kerangka teori

II.6 Kerangka Konsep



Gambar 7. Kerangka Konsep



II.7 Hipotesis

Kadar *8-Hidroxy-deoxyguanosine* dapat dijadikan biomarker kerusakan oksidatif pada penderita hipertensi lansia awal.

II.8 Definisi Operasional

Tabel 3 : Definisi Operasional

No.	Variabel	Defenisi Operasional	Unit	Skala
1	Usia kronologis	Usia berdasarkan tanggal kelahiran		Nominal
2	Kontrol sehat	-Subyek yang secara klinik tidak menderita Hipertensi , penyakit sistemik atau somatik		Nominal
3	Jenis Kelamin	Secara biologis yang dibagi atas laki-laki dan perempuan	Ordinal	
4	8-OHdG	Penanda kerusakan oksidatif	Ng/dl	Interval
5	Hipertensi	Tertera dalam rekam medis. Dan berdasarkan JNC VII TD diastolik ≥ 140 mmHg dan atau sistolik ≥ 90 mmHg	mmHg	Interval

BAB III

METODE PENELITIAN

III.A Rancangan Penelitian

Pada penelitian ini digunakan metode penelitian analitik dengan pendekatan kuantitatif berupa pengumpulan dan pengukuran data yang berupa angka. Penelitian ini merupakan penelitian analitik dengan memakai desain penelitian cross sectional, dengan membandingkan kadar *8-Hidroxy-deoxyguanosine (8-OHdG)* pada kelompok kasus dan kelompok kontrol sehat. Kelompok kasus adalah kelompok lansia awal dengan hipertensi dan kelompok kontrol sehat adalah kelompok lansia awal tanpa hipertensi.

Teknik pengumpulan sampel yang akan dipakai dalam penelitian ini adalah teknik *purposive sampling* yang merupakan teknik sampling non random sampling yang oleh peneliti yang sebelumnya telah menetapkan ciri-ciri khusus sesuai tujuan penelitian. Selanjutnya peneliti mendeskripsikan gejala yang terjadi dari data yang diperoleh dan menganalisis untuk mendapatkan gambaran tentang penelitian ini.



Gambar 8. Rancangan Penelitian.

Sampel penelitian yang diambil pada penderita kelompok kasus (penderita hipertensi) pada lansia awal yaitu berupa urin pagi. Demikian juga pada kelompok kontrol sehat.

Pengambil sampel urin dengan cara mendatangi langsung ke rumah penderita hipertensi. Demikian juga untuk pengambilan urin pada kontrol sehat.

III.B Lokasi dan Waktu Penelitian

1. Tempat Penelitian

- a. Puskesmas Kalukubodoa dan puskesmas Mangasa di kota Makassar
- b. Unit penelitian di laboratorium HUMRC/Rumah Sakit Pendidikan Universitas Hasanuddin untuk pemeriksaan kadar *8-Hydroxy-deoxyguanosine* (8-OHdG) dengan menggunakan metode *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA).

2. Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan pada bulan September 2020 sampai hasil penelitian dipresentasikan.

III.C Populasi dan Sampel Penelitian

Populasi penelitian adalah penderita hipertensi pada usia lansia awal. Data diambil dari data rekam medik di Puskesmas Kalukubodoa dan Puskesmas Mangasa. Populasi penelitian harus memenuhi kriteria inklusi, antara lain : menderita hipertensi, berusia lansia awal umur 46-55 tahun berdasarkan kategori DEPKES RI 2009, tidak ada riwayat kelainan somatik atau kejiwaan terdaftar dalam catatan medis, tidak ada riwayat pengobatan, merokok atau konsumsi alkohol selama sebelumnya 2 minggu, dan responden menyetujui serta menandatangani *informed consent*.

Kriteria eksklusi, antara lain : mempunyai riwayat mengonsumsi suplemen antioksidan atau obat antiinflamasi sistemik dalam satu bulan terakhir atau sesuai waktu paruh tiap obat, pasien dengan kelainan sistemik (keganasan, diabetes melitus, gangguan hepar, gangguan ginjal, gangguan jantung).

Sampel penelitian diperoleh dari urin. urin spot dikumpulkan, dan konsentrasi 8-OHdG dianalisis menggunakan ELISA. Tingkat urin 8-OHdG dinormalisasi relatif terhadap jumlah kreatinin.

III.D. Perkiraan Besar Sampel.

Penentuan besar jumlah sampel yang dibutuhkan dalam penelitian ini ditetapkan melalui teknik *purposive sampling* dengan jumlah sampel dihitung berdasarkan rumus variable kuantitatif.

$$\frac{2SD^2 (Z_{\alpha/2} + Z_{\beta})}{d^2}$$

SD = Standar deviasi dari studi sebelumnya

$Z_{\alpha/2}$ = Variasi standar normal untuk level signifikan

Z_{β} = Variasi standar normal untuk kekuatan penelitian

d^2 = Perbedaan nilai 8-OHdG

$$= \frac{2(39,62)^2(1,96 + 0,84)^2}{(40,75)^2}$$

$$= \frac{(2.021,2)(7,84)}{1660,56}$$

$$= \frac{15.846,2}{1660,56}$$

$$= 14,82$$

$$= 15$$

Pada penelitian ini, nilai proporsi yang ditetapkan didasarkan pada penelitian hubungan lama paparan sinar matahari dengan kadar *8-Hydroxy-deoxyguanosine* (8-OHdG) urin pada lansia akhir yang mendapat standar deviasi *8-Hydroxy-deoxyguanosine* (8-OHdG) sebesar 39,62 dan rata-rata perbandingan nilai *8-Hydroxy-deoxyguanosine* (8-OHdG) sebesar 40,75. Pada penelitian ini menggunakan kekuatan β 80% sehingga $Z_{\beta} = 0,84$ dan eror tipe sebesar 5% sebesar $Z_{\alpha/2} = 1,96$. Sehingga besarnya jumlah sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah minimal memakai 20 sampel penelitian untuk masing-masing kelompok, sehingga jumlah sampel yang akan digunakan dalam penelitian ini yaitu 20 sampel untuk kelompok kasus (hipertensi) dan 20 sampel untuk kelompok kontrol sehat.

III.E. Instrumen Penelitian

Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini sebagai berikut :

- Multichannel pipet
- Micropipet
- Inkubator
- ELISA reader

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini sebagai berikut :

- Urin
- ELISA kit
- Tabung microcentrifuge
- Reservoir
- Aquadest
- Tip 100-100uL
- Tip 10-200uL
- Tabung Falcon 50 ml
- Sarung tangan
- Tissue
- Pulpen dan kertas

Cara Kerja.

a. Kit ELISA 8-OHdG Eropa

- Penyimpanan : 2-8 °C
- Validitas : enam bulan
- Sensitivitas dengan pengujian ini adalah 0.1ng/MI

- Konsentrasi standar diikuti oleh : 20, 10, 5, 2, 5, 1.25, 0ng/mL CV intra-tes dan inter-uji
- CV kurang dari 15%

b. Manfaat kit 8-OHdG ELISA

Kit 8-OHdG ELISA digunakan di laboratorium hanya untuk penelitian dan tidak digunakan dalam prosedur diagnostik atau terapeutik. Stop solution mengubah warna dari warna biru menjadi kuning dan intensitas warna yang diukur pada 450 nm menggunakan spektrofotometer. Kit 8-OHdG ELISA ini mencakup seperangkat.

c. Pengumpulan dan Penyimpanan Sampel

- Urin
- Dikumpulkan pada pot sebanyak 5-10 cc.

Sampel disentrifugasi 10.000 rpm dalam 20 menit dan segera uji aliquot. Selanjutnya, sampel disimpan pada -20 °C atau -80 °C

- Hindari siklus pencairan berulang.

d. Tindakan Pencegahan

- Jangan mengganti perangkat kit dari yang lain.
Gunakan sandar, konjugat, dan pelat mikro yang cocok untuk kinerja yang optimal.
- Gunakanlah hanya agen yang disediakan langsung oleh pabrik.
- Jangan lepaskan pelat dari tas penyimpanan.

Strip yang tidak terpakai harus disimpan pada suhu 2-8 °C dengan kantong yang disediakan.

e. Preparasi Reagen

- 20 x larutan pencuci : encerkan dengan air suling dan deionisasi 1:20.

f. Prosedur Assay

- Persiapkanlah reagen-reagen yang akan dipakai. Sampel yang akan diperiksa dan di uji sebanyak dua kali.
- Tambahkan sebanyak 50 µl sampel yang akan diperiksa dan standar 8-OHdG ke dalam sumur 8-OHdG *Conjugated coated plate*. Lalu sampel di inkubasi pada suhu kamar selama 1 menit.
- Sebanyak 50 µl anti 8-OHdG ditambahkan, lalu di lakukan inkubasi sampel di suhu kamar selama 1 jam.
- Lakukan pencucian *microwell strips* sebanyak 3 kali dengan 250 µl *wash Buffer* pada setiap sumur. Setelah melakukan pencucian, sumur dikosongkan dan dibersihkan dari *wash buffer*.
- Sebanyak 100 µl *Secondary Antibody – Enzyme Conjugate* ditambahkan ke dalam seluruh sumur. Selanjutnya dilakukan selama 1 jam di suhu kamar.
- Dengan menggunakan 250 µl *wash Buffer* pada setiap sumur ,lakukan pencucian *microwell strips* sebanyak 3 kali. Setelah melakukan pencucian , sumur dikosongkan dan dibersihkan dari *wash buffer*.
- *Substrate Solution* dihangatkan sesuai suhu kamar. Kemudian Tambahkan *substrate solution* tersebut sebanyak 100 µl ke dalam

tiap-tiap sumur termasuk sumur blanko. Lakukan inkubasi selama 30 menit di suhu kamar.

- Hentikan reaksi enzyme dengan melakukan penambahan 100 μ l *Stop Solution* ke dalam tiap-tiap sumur termasuk sumur blanko. Amatilah warna di setiap sumur.
- Absorbansi di setiap microwell dibaca menggunakan spektroskopi UV-Vis di panjang gelombang maksimum sebesar 450 nm.

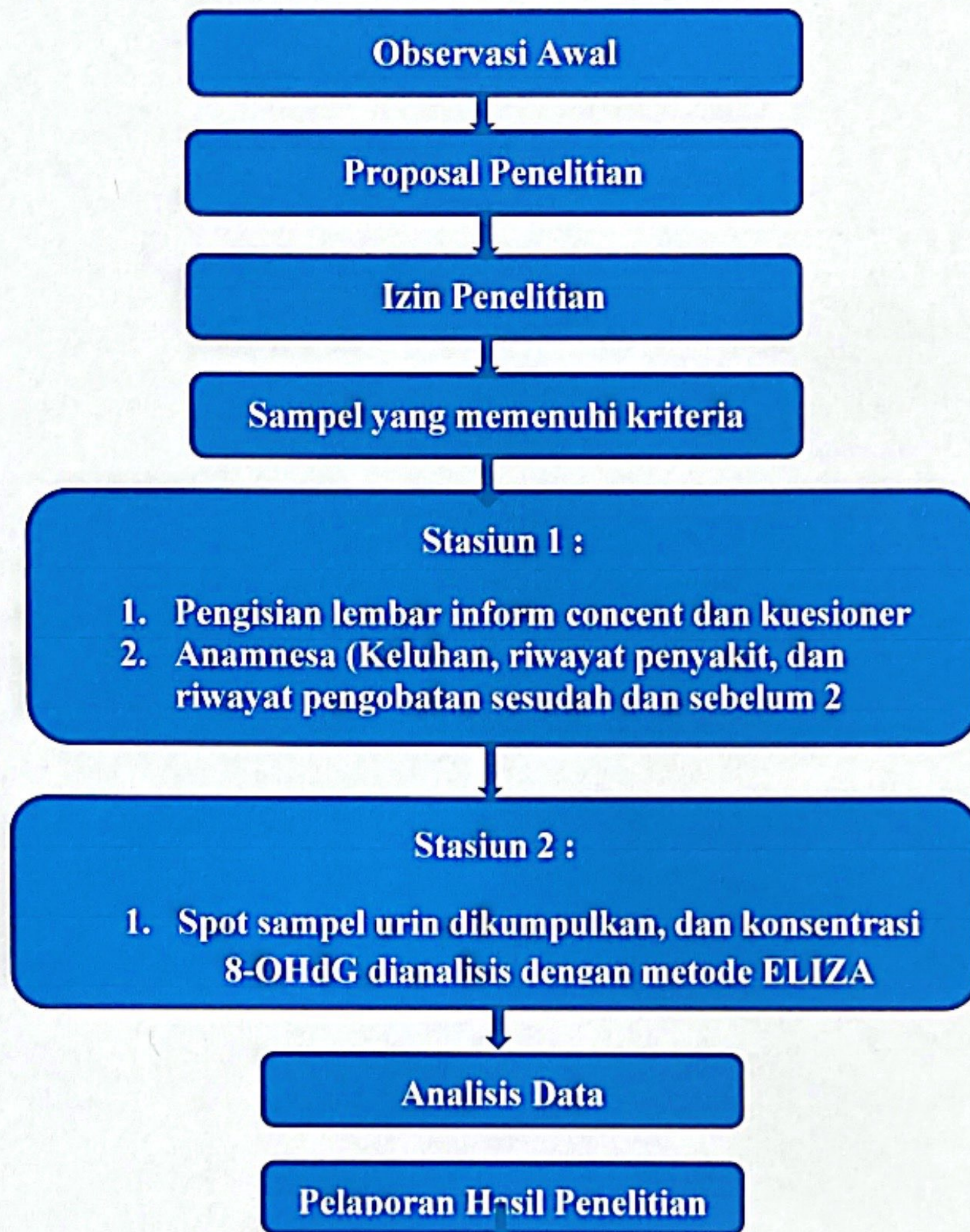
g. Perhitungan Hasil

- Kurva standar ini digunakan dalam menentukan jumlah dalam sampel

III.F. Izin Penelitian dan Kelayakan Etik

Penelitian ini disetujui oleh Komite Etik Kedokteran Indonesia. Peserta penelitian dewasa menandatangani formulir persetujuan setelah mereka diberitahu tentang tujuan penelitian. Penelitian ini dilakukan sesuai dengan rekomendasi Pedoman Penelitian Biomedis yang melibatkan sampel urin manusia, dengan persetujuan tertulis dari semua subyek.

III.G. Alur Penelitian



Gambar 9. Alur Penelitian

III.H. Teknik Pengumpulan Data

Berdasarkan dengan alur penelitian diatas, penelitian ini diawali dari tahap persiapan data. Sebelum penelitian dimulai, peneliti mempersiapkan segala perizinan, persuratan dan melakukan observasi terlebih dahulu sebelum memulai penelitian ini. Kemudian selanjutnya menentukan pertanyaan-pertanyaan terkait penelitian yang dituangkan ke dalam rumusan masalah. Lalu kemudian, menentukan hal-hal yang berhubungan populasi dan sampel penelitian sebelum memasuki ke tahap pelaksanaan penelitian.

III.I. Analisis Data

Data yang didapat selanjutnya dianalisis menggunakan computer dengan menggunakan *Statistical Product and Service Solution (SPSS)*. Hasil yang diperoleh disajikan dalam bentuk narasi dilengkapi dengan grafik atau tabel variable-variabel yang diperiksa, dan dianalisis secara univariat untuk melihat hasil secara deskriptif dan analisis bivariate untuk melihat hubungan antara variable yang diteliti.