

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Diabetes melitus (DM) tipe 2 adalah suatu kelompok penyakit metabolik yang ditandai dengan hiperglikemia yang terjadi karena kelainan sekresi insulin, kerja insulin atau keduanya (PERKENI, 2021). Diabetes melitus tipe 2 muncul secara klinis ketika tubuh tidak mampu lagi memproduksi cukup insulin untuk mengompensasi peningkatan insulin resisten (Decroli, 2019). Kriteria diagnosis DM tipe 2 menurut *American Diabetes Association* (ADA) 2023 adalah hasil pemeriksaan glukosa plasma puasa ≥ 126 mg/dL atau hasil pemeriksaan glukosa plasma ≥ 200 mg/dL setelah tes toleransi glukosa oral (TTGO) atau hasil glukosa plasma sewaktu ≥ 200 mg/dL dengan keluhan klasik atau hasil HbA1c $\geq 6,5\%$ (EISayed et al., 2023).

Diabetes melitus tipe 2 menjadi masalah kesehatan dunia karena prevalensi dan insidensi penyakit ini terus meningkat, baik di negara maju maupun negara berkembang (Decroli, 2019). Hasil Riskesdas 2018 menunjukkan prevalensi diabetes melitus di Indonesia pada umur ≥ 15 tahun sebesar 2% (Kemenkes RI, 2019). Indonesia menempati peringkat kelima dunia dengan jumlah penderita DM terbanyak pada penduduk usia 20-79 tahun, yaitu sebesar 19,5 juta menurut proyeksi *International Diabetes Federation* (IDF) pada tahun 2021 (IDF, 2021). Komplikasi akut DM meliputi krisis hiperglikemia (ketoasidosis diabetes dan *hyperosmolar hiperglikemia state*) dan krisis hipoglikemia, sedangkan komplikasi kronik berupa komplikasi makrovaskuler dan mikrovaskuler (Decroli, 2019).

Advanced Glycation End-products (AGEs) dikenal juga sebagai glikotoksin, merupakan berbagai kelompok senyawa sangat teroksidasi yang terlibat dalam kejadian diabetes dan sejumlah penyakit kronik lain. *Advanced Glycation End-products* terbentuk melalui proses non-enzimatik penambahan gula tereduksi pada asam amino bebas dari lemak, protein dan asam nukleat (Mulyati, 2016). Sejumlah data mengindikasikan AGEs dapat menyebabkan kerusakan sel β dan resistensi insulin perifer. Pembentukan AGEs akan mengakibatkan disfungsi glomerulus, mempercepat aterosklerosis, menghambat pembentukan *nitric oxide* dan mempengaruhi komposisi dan struktur matrik ekstraseluler. Penurunan sintesis *nitric oxide* akan menyebabkan disfungsi endotel. Kadar glukosa darah yang tinggi juga akan meningkatkan jalur heksosamin (*hexosamin pathway*) yang akan membentuk fruktosa 6 fosfat yang merupakan substrat *O-linked glycosilation* dan produksi proteoglikan. Hal ini akan menghambat pembentukan *nitric oxide* yang mengakibatkan disfungsi endotel (Kasper et al., 2016).



dilakukan untuk menemukan penyebab hiperglikemia, salah satu sumber energi utama harian tubuh, namun konsumsi jangka panjang dan kualitas yang tidak tepat dapat menjadi sumber utama dan komplikasinya. Makanan di era modern saat ini diolah pada suhu tinggi yang berpotensi memicu pembentukan AGEs pro-

inflamasi yang bersifat oksidatif. Beberapa metode pemrosesan makanan, terutama pemanasan dan pengeringan meningkatkan secara signifikan pembentukan komponen *dicarbonyl* baru yang sangat reaktif melalui reaksi kompleks *glycol*- dan lipooksidasi. Sekitar 10% AGEs dari makanan kaya AGE (*AGEs-rich meal*) diabsorpsi ke sirkulasi dan dua per tiganya tetap beredar dalam tubuh selama tujuh jam kemudian, waktu yang cukup lama untuk merusak jaringan (Mulyati, 2016). Kandungan AGEs dalam bahan makanan dipengaruhi oleh metode pemrosesan yang digunakan. Metode pemanasan kering, seperti memanggang, membakar atau menggoreng, secara signifikan meningkatkan kadar AGEs yang terbentuk dari protein dan lemak dibandingkan dengan metode pemasakan yang menggunakan suhu dan kelembapan lebih rendah, seperti merebus, mengukus atau mendidih. Selain itu, jumlah dan jenis zat gizi yang sama, seperti lemak, dapat menghasilkan tingkat oksidan yang berbeda, yang juga berpotensi menstimulasi respons antigen (Uribarri et al., 2011). Asupan AGEs dari makanan dapat dikurangi dengan menurunkan suhu saat memasak makanan, mempercepat durasi pengolahan makanan, meningkatkan kelembapan dan menggunakan kandungan bahan makanan dengan pH rendah (Sergi et al., 2021).

Salah satu jalur hiperglikemia yang merusak sel adalah melalui pembentukan AGEs yang meningkatkan stres oksidatif sistemik dan intraseluler. Sejumlah data mengindikasikan AGEs dapat menyebabkan kerusakan sel β dan resistensi insulin perifer (Mulyati, 2016). Diet rendah AGEs pada individu dengan atau tanpa diabetes atau penyakit ginjal kronik terbukti sangat efektif menurunkan AGEs dalam sirkulasi, inflamasi dan resistensi insulin (Uribarri et al., 2011). Keseimbangan antara reseptor AGEs dapat berpengaruh dalam keseimbangan homeostasis oksidan atau perkembangan diabetes. Studi menunjukkan bahwa AGER1 berperan dalam melindungi *sirtuin* (*silent mating type information regulation 2 homolog*) 1 (SIRT1), sebuah komponen deasetilase utama dan pengatur kerja inflamasi dan insulin. Sirtuin sama seperti AGER1, tersupresi pada diabetes kronik, tetapi dapat membaik setelah beban oksidan eksternal dari AGEs direstriksi (Cai et al., 2010). Manusia dewasa sehat mengabsorpsi cepat AGEs yang berdampak pada peningkatan cepat kadar AGE serum. *Low AGE diet* memperbaiki hiperinsulinemia pada individu DM tipe 2, menunjukkan bahwa AGEs eksogen berpartisipasi aktif dalam gangguan metabolisme pada DM tipe 2 (Uribarri et al., 2011).

Sebuah penelitian di China pada tahun 2019 menemukan bahwa kadar AGEs signifikan lebih tinggi pada pasien diabetes gestasional dibandingkan kelompok kontrol ($54,27 \pm 18,28$ vs $32,18 \pm 12,12$ ng/mL) dengan nilai $p < 0,001$ (Li et al., 2019). Penelitian ini melibatkan 72 pasien dengan diabetes gestasional dan 80 wanita hamil



mpok kontrol menggunakan sampel jaringan plasenta untuk is. Penelitian ini juga menemukan bahwa kadar AGEs, visfatin (-6) pada jaringan plasenta di kedua kelompok berhubungan hid, produk peroksidasi lipid dan dihasilkan oleh degradasi uksi oleh ROS dalam kondisi patogenik. Perubahan kadar t digunakan untuk mencerminkan kerusakan oksidatif dalam

Asymmetric dimethylarginine (ADMA) adalah penghambat kompetitif *nitric oxide synthase* (NOS) (Banjarnahor & Damayanti, 2023). *Asymmetric dimethylarginine* merupakan turunan asam amino yang disintesis selama metilasi protein L-arginine oleh enzim spesifik *protein arginine methyltransferase 1* (PRMT 1) (Siervo & Bluck, 2012). Kadar ADMA plasma yang tinggi ditemukan pada pasien diabetes yang mengalami komplikasi mikrovaskuler di retina, saraf dan ginjal (Banjarnahor & Damayanti, 2023). Sebuah meta-analisis menemukan bahwa ADMA memiliki peran dalam asal mula komplikasi mikrovaskuler pada pasien diabetes (Liu et al., 2019). Stres oksidatif yang diinduksi hiperglikemia menyebabkan akumulasi ADMA yang dapat berkontribusi pada disfungsi vasodilator endotel yang diakibatkan oleh produksi *nitric oxide* (NO) yang tidak mencukupi (Banjarnahor & Damayanti, 2023).

Penelitian di Turki menemukan bahwa kadar ADMA lebih tinggi secara signifikan pada pasien diabetes dibandingkan kelompok kontrol (Yaşar et al., 2011). Kadar ADMA plasma yang tinggi ditemukan pada pasien diabetes yang mengalami komplikasi mikrovaskuler di retina, saraf dan ginjal (Banjarnahor & Damayanti, 2023). Sebuah meta-analisis menemukan bahwa ADMA memiliki peran dalam asal mula komplikasi mikrovaskuler pada pasien diabetes (Liu et al., 2019). Pasien diabetes dengan komplikasi vaskular menunjukkan kadar ADMA yang berkorelasi positif dengan glukosa serum postprandial dan HbA1c dibandingkan dengan pasien tanpa komplikasi (Alkady & Ibrahim, 2019).

Ketika sel endotel manusia atau *human microvascular endothelial cell* (HMEC-1) dan sel otot polos pembuluh darah terpapar pada media glukosa tinggi, aktivitas *Dimethylarginine dimethylaminohydrolase* (DDAH) berkurang secara signifikan (Banjarnahor & Damayanti, 2023). Stres oksidatif yang diinduksi hiperglikemia menyebabkan akumulasi ADMA yang dapat berkontribusi pada disfungsi vasodilator endotel yang diakibatkan oleh produksi *nitric oxide* (NO) yang tidak mencukupi (Banjarnahor & Damayanti, 2023). Sebuah studi *cross-sectional* bahwa peningkatan konsentrasi ADMA juga dapat menghambat penyerapan glukosa yang dirangsang insulin pada otot rangka dengan mengubah pensinyalan insulin (Lee et al., 2018). Secara patofisiologis, ADMA dapat dijadikan biomarker potensial resistensi insulin pada otot rangka (Lee et al., 2018).

Sebuah penelitian di China pada tahun 2021 menemukan bahwa kadar ADMA lebih tinggi secara signifikan pada pasien dengan karsinoma lambung (Q. Guo et al., 2021). Penelitian ini melibatkan 115 pasien karsinoma lambung dengan 110 subjek normal sebagai kontrol untuk membandingkan kadar serum ADMA antara dua kelompok. Penelitian ini juga melaporkan kadar ADMA yang tinggi erat hubungannya dengan kedalaman invasi tumor, stadium klinis, diferensiasi yang buruk dan hasil



ikemia pada penderita DM tipe 2 akan meningkatkan AGEs dan akan merusak dan mengganggu aktivitas enzim *Dimethylarginine dimethylaminohydrolase* (DDAH 1) sehingga tidak dapat mendegradasi ADMA. Hal ini akan meningkatkan kadar ADMA di dalam darah. Kondisi hiperglikemia dan stres oksidatif yang akan meningkatkan ekspresi enzim PRMT 1 juga akan meningkatkan kadar ADMA (Siervo & Bluck, 2012). Peningkatan

ADMA akan menyebabkan terganggunya pembentukan NO dan meningkatkan NOS *uncouple* sehingga menyebabkan terjadinya disfungsi endotel yang akan berakhir pada penyakit kardiovaskuler (Sukhovshin et al., 2015). Kadar ADMA plasma berhubungan positif dengan kadar AGE serum dan berkorelasi terbalik dengan fungsi endotel (Ando et al., 2013).

Mekanisme kerusakan endotel pembuluh darah pada penderita DM dapat melalui berbagai jalur (Hariawan & Suastika, 2008). Kadar glukosa darah yang tinggi dapat menyebabkan peningkatan kadar glukosa intraseluler yang akan menyebabkan pembentukan AGEs melalui glikolisasi non enzimatis protein intra dan ekstraseluler. Pembentukan AGEs akan mengakibatkan disfungsi glomerulus, mempercepat aterosklerosis, menghambat pembentukan *nitric oxide* dan mempengaruhi komposisi dan struktur matrik ekstraseluler. Penurunan sintesis *nitric oxide* akan menyebabkan disfungsi endotel. Kadar glukosa darah yang tinggi juga akan meningkatkan jalur heksosamin (*hexosamin pathway*) yang akan membentuk fruktosa 6 fosfat yang merupakan substrat *O-linked glycosilation* dan produksi proteoglikan. Hal ini akan menghambat pembentukan *nitric oxide* yang mengakibatkan disfungsi endotel (Kasper et al., 2016).

Penurunan produksi *nitric oxide* pada DM melalui mekanisme penghambatan enzim dimetilarginin diaminohidrolase (DDAH) (Hariawan & Suastika, 2008). Enzim ini berperan dalam menguraikan ADMA (suatu inhibitor terhadap *nitric oxide* sintase) sehingga kadar ADMA meningkat dan menghambat pembentukan *nitric oxide*. Saat ini ADMA telah diterima sebagai suatu mekanisme dasar terjadinya disfungsi endotel. Enzim DDAH merupakan mekanisme utama bagaimana faktor risiko kardiovaskuler menghambat jalur sintesis *nitric oxide*. Aktivitas DDAH terganggu oleh stres oksidatif sehingga menimbulkan penumpukan kadar ADMA dalam plasma. Pada kadar ADMA yang patologis, beberapa faktor risiko penyakit kardiovaskuler seperti paparan rokok, kolesterol LDL teroksidasi, hiperhomosisteinemia dan hiperglikemia menimbulkan stres oksidatif pada endotelial. Masing-masing kondisi ini menekan aktivitas enzim DDAH baik secara *in vitro* maupun *in vivo* (Stühlinger et al., 2003).

Disfungsi endotel merupakan gambaran umum dari penderita DM tipe 2 dan secara langsung berhubungan dengan peningkatan risiko penyakit kardiovaskuler. Beberapa mekanisme berkontribusi terhadap fenotip disfungsi endotel antara lain perubahan metabolisme glukosa, gangguan sinyal insulin, peningkatan ROS dan hipertensi arteri sistemik. Peningkatan stres oksidatif di lingkungan hiperglikemik mempercepat glikooksidasi protein dan lipid untuk menghasilkan efek lanjutan berupa AGEs. Terakumulasinya AGEs di dalam dinding pembuluh darah secara langsung akan mengganggu struktur dan fungsi sel. Aktivasi RAGE pada sel endotel



osintesis NO oleh penurunan *endothelial nitric oxide synthase* meningkatkan ROS. Ion peroksinitrit yang sangat oksidan dibentuk menghambat NO, sehingga eNOS menghasilkan anion superoksida menghambat endogen eNOS. Kontrol glikemik yang buruk telah meningkatkan peroksidasi lipid, peningkatan nilai ADMA dan Aktivasi RAGE menginduksi ekspresi adhesi molekul sel

endotel, *tissue factor*, sitokin pro inflamasi dan *monocyte chemoattractant protein-1* (Vazzana et al., 2012).

Berdasarkan latar belakang di atas, peneliti tertarik melakukan penelitian mengenai analisis AGEs serum dengan ADMA serum pada subjek diabetes melitus tipe 2.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan uraian dalam latar belakang masalah di atas, dapat dirumuskan pertanyaan penelitian sebagai berikut: Bagaimana hubungan kadar AGEs serum dengan ADMA serum pada subjek diabetes melitus tipe 2?

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan umum

Diketahuinya hubungan AGEs serum dengan ADMA serum pada subjek diabetes melitus tipe 2.

1.3.2 Tujuan khusus

1. Diketahuinya kadar AGEs serum pada subjek diabetes melitus tipe 2.
2. Diketahuinya kadar ADMA serum pada subjek diabetes melitus tipe 2.
3. Diketahuinya hubungan kadar AGEs serum dengan kadar ADMA serum pada subjek diabetes melitus tipe 2.
4. Diketahuinya hubungan kadar AGEs serum dengan kadar ADMA serum berdasarkan jenis kelamin.
5. Diketahuinya hubungan karakteristik subjek penelitian dengan kadar ADMA serum.

1.4 Hipotesis Penelitian

Hipotesis penelitian ini yaitu terdapat korelasi positif antara kadar AGEs serum dengan ADMA serum pada subjek diabetes melitus tipe 2. Semakin tinggi kadar AGEs serum, semakin tinggi kadar ADMA serum.

1.5 Manfaat Penelitian

1.5.1 Manfaat teoritis

1. Memberikan informasi ilmiah tentang AGEs serum dengan ADMA serum pada subjek diabetes melitus tipe 2.
2. Menjadi data dasar dan bahan referensi untuk penelitian selanjutnya.

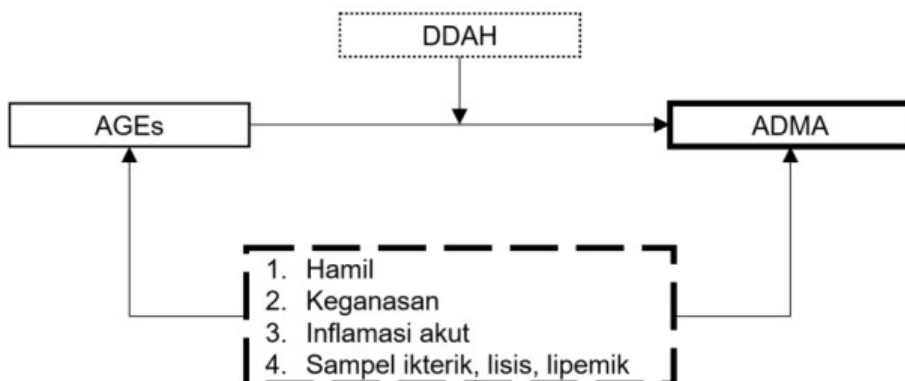
1.5.2 Manfaat praktis



diharapkan dapat membantu klinisi dalam penanganan pada melitus tipe 2.

ini dapat digunakan oleh penderita diabetes melitus tipe 2 si mengenai pencegahan komplikasi penyakit diabetes melitus

1.7 Kerangka Konsep



Keterangan:

 : Variabel bebas

 : Variabel tergantung

 : Variabel perancu

 : Variabel antara

ADMA : *Asymmetric Dimethylarginine*

AGEs : *Advanced Glycation End-Products*

DDAH : *Dimethylarginine dimethylaminohydrolase*



BAB II METODE PENELITIAN

2.1 Desain Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian observasional analitik menggunakan metode penelitian *cross sectional*.

2.2 Tempat dan Waktu Penelitian

2.2.1 Tempat penelitian

Tempat penelitian yaitu:

- Poliklinik Endokrin dan Metabolik RS Wahidin Sudirohusodo dan jejaringnya untuk pengambilan sampel.
- Laboratorium Patologi Klinik RS Wahidin Sudirohusodo untuk pengambilan sampel dan pemeriksaan sampel.
- Unit Penelitian Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin/RSPTN Universitas Hasanuddin untuk pemeriksaan sampel.

2.2.2 Waktu penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Juli 2024 sampai Maret 2025.

2.3 Populasi Penelitian

Semua penderita DM tipe 2 yang berobat di Poliklinik Endokrin dan Metabolik RS Wahidin Sudirohusodo dan jejaringnya.

2.4 Sampel dan Cara Pengambilan Sampel

Sampel penelitian adalah semua populasi terjangkau yang didiagnosis DM tipe 2 oleh klinisi di Poliklinik Endokrin dan Metabolik RS Wahidin Sudirohusodo dan jejaringnya serta memenuhi kriteria inklusi. Pengumpulan sampel dilakukan dengan cara *consecutive sampling* yaitu semua pasien yang memenuhi kriteria penelitian dimasukkan dalam sampel penelitian sampai besar sampel terpenuhi.

2.4.1 Perkiraan besar sampel

Perkiraan besar sampel dihitung berdasarkan rumus:

$$n = \frac{(Z \alpha)^2 PQ}{d^2}$$

Keterangan :

Z α : Nilai Standar untuk 0,05 = 1,96, Z α^2 = 3.84

P: Proporsi variabel yang diteliti = 0,25



5

margin absolut yang dikehendaki = 0,1

$$n = \frac{3,84 \times 0,25 \times 0,75}{0,1^2} = \approx 72$$

Berdasarkan rumus di atas didapatkan jumlah minimal sampel adalah 72 sampel.

2.5 Kriteria Inklusi dan Eksklusi

2.5.1 Kriteria inklusi

- Pasien umur \geq 18 tahun.
- Pasien yang didiagnosis diabetes melitus tipe 2 oleh klinisi.
- Bersedia ikut dalam penelitian dengan menandatangani *informed consent*.

2.5.2 Kriteria eksklusi

- Wanita hamil.
- Pasien DM dengan penyakit keganasan.
- Inflamasi akut.
- Sampel ikterik, lisis dan lipemik.

2.6 Izin Penelitian dan *Ethical Clearance*

Setiap tindakan dalam pelaksanaan penelitian ini dilakukan seizin dan sepengetahuan subjek yang dijadikan sampel penelitian melalui lembar *informed consent*. Kelayakan etik penelitian ini diperoleh dari Komite Etik Penelitian Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin-Rumah Sakit Universitas Hasanuddin-Rumah Sakit Wahidin Sudirohusodo Makassar (KEPK FKUH-RSUH-RSWS) dengan nomor *Ethical Clearance*: 601/UN4.6.4.5.31/PP36/2024.

2.7 Cara Kerja

2.7.1 Alokasi subjek

Subjek adalah semua penderita DM tipe 2 yang melakukan pemeriksaan di Poliklinik Endokrin dan Metabolik RS Wahidin Sudirohusodo yang memenuhi kriteria inklusi dan bersedia mengikuti penelitian.

2.7.2 Cara penelitian

- Peneliti menjelaskan tentang maksud dan tujuan penelitian kepada subjek penelitian. Subjek penelitian diminta menandatangani lembar persetujuan yang telah disediakan jika setuju ikut serta dalam penelitian.
- Subjek yang telah menandatangani lembar persetujuan kemudian dilakukan anamnesis, pemeriksaan fisik dan pengambilan darah vena sekitar 3-5 mL.
- Pengolahan dan penyimpanan sampel darah.
- Subjek dilakukan pemeriksaan kadar AGEs serum dan ADMA serum.

2.7.3 Prosedur pemeriksaan *Advanced Glycation End-Products (AGEs)*

- Pra analitik
 - Persiapan pasien
Tidak ada persiapan khusus.



Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah serum yang diperoleh dari flebotomi. Sampel dari tabung tanpa antikoagulan dibiarkan selama 2 jam pada suhu kamar atau 24 jam pada suhu 4°C dan sentrifugasi selama 15 menit dengan kecepatan 1000 rpm. Sampel serum dikumpulkan untuk dilakukan pengujian. Sampel serum disimpan pada suhu -20°C sampai 3 bulan.

c. Alat dan bahan

1) Alat: inkubator, *plate shaker*, *microplate reader* dengan filter 450 nm, mikropipet, *assay plate*, tip pipet mikro, *tube disposable*, kertas *absorbent*, *Microelisa stripplate*.

2) Bahan: serum, air suling, larutan standar, reagen AGEs

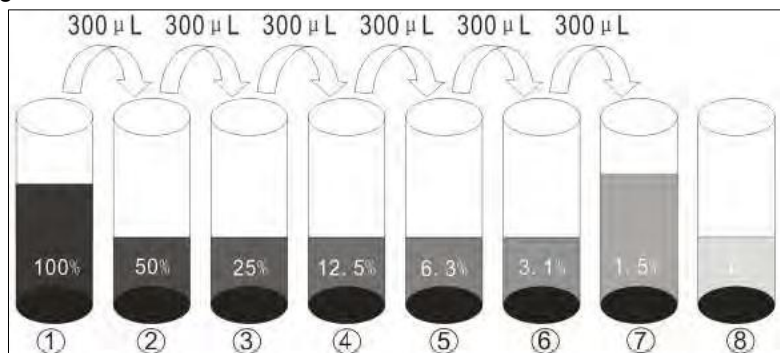
d. Persiapan Reagen dan Standar

1) Keluarkan kit ELISA dari lemari es 20 menit sebelum digunakan.

2) Encerkan *wash buffer* pekat dengan air suling (1:25).

3) Tambahkan 1,0 mL pengencer standar ke dalam botol standar teriofiliasi dan diamkan selama 30 menit. Setelah standar benar-benar larut, campurkan sedikit dan tandai dengan label pada tabung. Direkomendasikan untuk menggunakan nilai konsentrasi berikut ini untuk kurva standar: 200, 100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,12 ng/mL. Catatan: pastikan standar teriofilisasi benar-benar larut dan tercampur rata.

4) Metode pengenceran sampel standar (Gambar 1): ambil 7 tabung bersih dan beri label dengan konsentrasi yang diharapkan (100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,12, 0 ng/mL). Tambahkan 300 μ L pengencer standar ke dalam setiap tabung. Pipet 300 μ L pengencer dari standar yang dilarutkan dan tambahkan ke tabung berlabel 50 ng/mL dan aduk rata. Selanjutnya pipet 300 μ L pengencer dari tabung 100 ng/mL dan tambahkan ke tabung 50 ng/mL dan aduk rata. Ulangi langkah-langkah ini melalui standar 3,12 ng/mL. Pengencer standar dalam tabung 0 ng/mL adalah kontrol negatif. Catatan: larutan standar yang telah dilarutkan harus dibuang setelah menjalankan pengujian tidak dapat digunakan kembali.



Gambar 1. Pengenceran Standar Reagen AGEs

Sumber: MyBioSource, USA, 2021a



biotinilasi: keluarkan volume larutan *Biotinylated Antibody* yang lengan jumlah sumur yang akan diuji dan encerkan dengan er antibodi dengan proporsi 1:100. Siapkan 30 menit nya dan direkomendasikan untuk tidak menggunakan kembali ngujian tambahan.

- 6) Enzim konjugat: buang larutan enzim konjugat dalam jumlah yang sesuai dengan jumlah sumur yang akan diuji dan encerkan dengan enzim *diluent* dalam proporsi 1:100. Siapkan 30 menit sebelumnya dan disarankan untuk tidak menggunakan kembali untuk pengujian tambahan.
- 7) Reagen warna: siapkan larutan reagen warna 30 menit sebelumnya dengan menambahkan reagen warna A dan reagen warna B dengan proporsi 9:1.

2. Analitik

a. Prinsip tes

Tes ini menggunakan *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) dengan metode kuantitatif *sandwich* untuk mengukur kadar AGEs. *Advanced Glycation End-Products* yang terdapat pada sampel ditambahkan ke dalam *well* yang telah dilapisi dengan antibodi monoklonal anti-AGEs kemudian diinkubasi. Antibodi anti-AGEs yang berlabel biotin ditambahkan untuk bereaksi dengan avidin-horseradish peroxidase (HRP) yang membentuk kompleks imun. Enzim yang tidak terikat setelah diinkubasi dikeluarkan dengan pencucian. Kemudian ditambahkan substrat dan warna larutan akan berubah sesuai dengan kadar AGEs pada sampel. Reaksi diakhiri dengan penambahan *acidic stop solution* dan absorbansi diukur pada 450nm.

b. Cara kerja

- 1) Keluarkan strip sesuai jumlah yang dibutuhkan, biarkan pada suhu ruangan.
- 2) Siapkan sumur kosong.
- 3) Tambahkan standar atau sampel ke dalam sumur yang sesuai (100 μ L untuk setiap sumur). Tutup sumur/piring dengan strip pita perekat dan inkubasi pada suhu 37°C selama 90 menit.
- 4) Siapkan sejumlah *Biotinylated Antibody* yang diperlukan 30 menit sebelumnya.
- 5) Cuci pelat ELISA 2 kali.
- 6) Tambahkan antibodi biotinilasi yang telah disiapkan ke setiap sumur (100 μ L per sumur). Tutup sumur reaksi dengan strip pita perekat dan inkubasi pada suhu 37°C selama 60 menit.
- 7) Siapkan sejumlah enzim konjugat yang diperlukan 30 menit sebelumnya.
- 8) Cuci pelat ELISA 3 kali.



kan enzim konjugat yang telah disiapkan ke setiap sumur selain osong (masing-masing 100 μ L). Tutup sumur dengan strip pita dan inkubasi pada suhu 37°C selama 30 menit.

at ELISA 5 kali.

kan 100 μ L reagen warna yang telah disiapkan ke dalam masing sumur (juga ke dalam sumur kosong), inkubasi g dari cahaya pada suhu 37°C. Ketika warna dari standar

tertinggi menjadi lebih gelap dan gradien warna muncul, inkubasi dapat dihentikan. Reaksi kromogenik harus dikontrol dalam waktu 30 menit.

- 12) Tambahkan 100 μL reagen warna C ke masing-masing sumur (juga ke dalam sumur kosong). Aduk rata. Baca *Optical Density* (OD) pada 450 nm dalam waktu 10 menit.

3. Paska analitik

Menurut konsentrasi standar dan nilai OD yang sesuai, untuk menghitung persamaan regresi linier dari kurva standar. Kemudian sesuai dengan nilai OD sampel, menghitung konsentrasi sampel yang sesuai. Rentang deteksi 3,12-200 ng/mL (MyBioSource, USA, 2021a).

2.7.4 Prosedur pemeriksaan *Asymmetric Dimethylarginine* (ADMA)

1. Pra analitik

a. Persiapan pasien

Tidak ada persiapan khusus.

b. Persiapan sampel

Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah serum yang diperoleh dari prosedur flebotomi. Sampel dari tabung tanpa antikoagulan dibiarkan menggumpal selama 2 jam pada suhu kamar atau 24 jam pada suhu 4°C sebelum disentrifugasi selama 10 menit dengan kecepatan 1000-3000 rpm. Supernatan dikumpulkan untuk dilakukan pengujian. Sampel serum disimpan pada suhu -20°C sampai 3 bulan.

c. Alat dan bahan

1) Alat: inkubator, *plate shaker*, *microplate reader* dengan filter 450nm, mikropipet, *assay plate*, tip pipet mikro, *tube disposable*, kertas *absorbent*, *Microelisa stripplate*.

2) Bahan: serum, air suling, larutan standar, reagen ADMA.

d. Persiapan Reagen dan Standar

1) Keluarkan kit ELISA dari lemari es 20 menit sebelum digunakan.

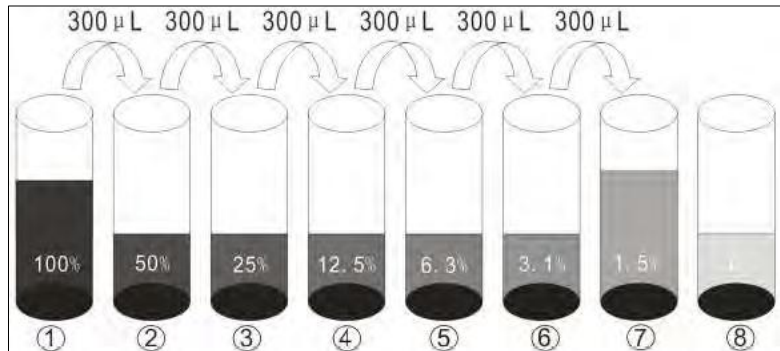
2) Encerkan *wash buffer* pekat dengan air suling (1:25).

3) Tambahkan 1,0 mL pengencer standar ke dalam botol standar terliofilisasi dan diamkan selama 30 menit. Setelah standar benar-benar larut, campurkan sedikit dan tandai dengan label pada tabung. Direkomendasikan untuk menggunakan nilai konsentrasi berikut ini untuk kurva standar: 5, 2,5, 1,25, 0,625, 0,312, 0,156, 0,78 $\mu\text{mol/L}$. Catatan: pastikan standar terliofilisasi benar-benar larut dan tercampur rata.

4) Metode pengenceran sampel standar (Gambar 2): ambil 7 tabung an beri label dengan konsentrasi yang diharapkan (2,5, 1,25, ,312, 0,156, 0,078, 0 $\mu\text{mol/L}$). Tambahkan 300 μL pengencer ke dalam setiap tabung. Pipet 300 μL pengencer dari standar arutkan dan tambahkan ke tabung berlabel 2,5 $\mu\text{mol/L}$ dan aduk lanjutnya pipet 300 μL pengencer dari tabung 2,5 $\mu\text{mol/L}$ dan an ke tabung 0,625 $\mu\text{mol/L}$ dan aduk rata. Ulangi langkah-



langkah ini melalui standar 0,078 $\mu\text{mol/L}$. Pengencer standar dalam tabung 0 $\mu\text{mol/L}$ adalah kontrol negatif. Catatan: larutan standar yang dilarutkan 5 $\mu\text{mol/L}$ harus dibuang setelah menjalankan pengujian tidak dapat digunakan kembali.



Gambar 2. Pengenceran Standar Reagen ADMA

Sumber: MyBioSource, USA, 2021b

- 5) Antibodi biotinilasi: keluarkan volume larutan *Biotinylated Antibody* yang sesuai dengan jumlah sumur yang akan diuji dan encerkan dengan pengencer antibodi dengan proporsi 1:100. Siapkan 30 menit sebelumnya dan direkomendasikan untuk tidak menggunakan kembali untuk pengujian tambahan.
 - 6) Enzim konjugat: buang larutan enzim konjugat dalam jumlah yang sesuai dengan jumlah sumur yang akan diuji dan encerkan dengan enzim *diluent* dalam proporsi 1:100. Siapkan 30 menit sebelumnya dan disarankan untuk tidak menggunakan kembali untuk pengujian tambahan.
 - 7) Reagen warna: siapkan larutan reagen warna 30 menit sebelumnya dengan menambahkan reagen warna A dan reagen warna B dengan proporsi 9:1.
2. Analitik
- a. Prinsip tes

Tes ini menggunakan *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) dengan metode *double antibody sandwich* untuk mengukur kadar ADMA. *Asymmetric Dimethylarginine* yang terdapat pada sampel ditambahkan ke dalam *well* yang telah dilapisi dengan antibodi monoklonal anti-ADMA kemudian diinkubasi. Antibodi anti-ADMA yang berlabel biotin ditambahkan aksi dengan avidin-horseradish peroxidase (HRP) yang kompleks imun. Enzim yang tidak terikat setelah diinkubasi dengan pencucian. Kemudian ditambahkan substrat dan warna berubah sesuai dengan kadar ADMA pada sampel. Reaksi penambahan *acidic stop solution* dan absorbansi diukur



b. Cara kerja

- 1) Keluarkan strip sesuai jumlah yang dibutuhkan, biarkan pada suhu ruangan.
- 2) Siapkan sumur kosong.
- 3) Tambahkan standar atau sampel ke dalam sumur yang sesuai (100 μ L untuk setiap sumur). Tutup sumur/piring dengan strip pita perekat dan inkubasi pada suhu 37°C selama 90 menit.
- 4) Siapkan sejumlah *Biotinylated Antibody* yang diperlukan 30 menit sebelumnya.
- 5) Cuci pelat ELISA 2 kali.
- 6) Tambahkan antibodi biotinilasi yang telah disiapkan ke setiap sumur (100 μ L per sumur). Tutup sumur reaksi dengan strip pita perekat dan inkubasi pada suhu 37°C selama 60 menit.
- 7) Siapkan sejumlah enzim konjugat yang diperlukan 30 menit sebelumnya.
- 8) Cuci pelat ELISA 3 kali.
- 9) Tambahkan enzim konjugat yang telah disiapkan ke setiap sumur selain sumur kosong (masing-masing 100 μ L). Tutup sumur dengan strip pita perekat dan inkubasi pada suhu 37°C selama 30 menit.
- 10) Cuci pelat ELISA 5 kali.
- 11) Tambahkan 100 μ L reagen warna yang telah disiapkan ke dalam masing-masing sumur (juga ke dalam sumur kosong), inkubasi terlindung dari cahaya pada suhu 37°C. Ketika warna dari standar tertinggi menjadi lebih gelap dan gradien warna muncul, inkubasi dapat dihentikan. Reaksi kromogenik harus dikontrol dalam waktu 30 menit.
- 12) Tambahkan 100 μ L reagen warna C ke masing-masing sumur (juga ke dalam sumur kosong). Aduk rata. Baca *Optical Density* (OD) pada 450 nm dalam waktu 10 menit.

3. Paska analitik

Menurut konsentrasi standar dan nilai OD yang sesuai, untuk menghitung persamaan regresi linier dari kurva standar. Kemudian sesuai dengan nilai OD sampel, menghitung konsentrasi sampel yang sesuai. Rentang deteksi 0,078-5 μ mol/L (MyBioSource, USA, 2021b).

2.8 Definisi Operasional dan Kriteria Objektif

Definisi operasional dan kriteria objektif pada penelitian ini yaitu:

1. Penderita diabetes melitus tipe 2 adalah semua penderita yang didiagnosis tipe 2 oleh klinisi berdasarkan data rekam medis subjek. *Advanced Glycation End-Products* serum dikenal juga sebagai glikotoksin, sebagai kelompok senyawa sangat teroksidasi yang terlibat dalam patofisiologi dan sejumlah penyakit kronik lain. Kadar AGEs dalam pemeriksaan menggunakan sampel serum subjek DM tipe 2 dengan



metode ELISA menggunakan *Human Advanced Glycation End Products ELISA Kit MyBioSource*, USA (MBS267540) dengan rentang deteksi 3,12-200 ng/mL.

3. *Asymmetric Dimethylarginine* serum merupakan turunan asam amino yang disintesis selama metilasi protein L-arginine oleh enzim spesifik PRMT 1. Kadar ADMA dalam penelitian ini diperiksa menggunakan sampel serum subjek DM tipe 2 dengan metode *ELISA* menggunakan *Human Asymmetric dimethylarginine ELISA Kit MyBioSource*, USA (MBS264847) dengan rentang deteksi 0,078-5 $\mu\text{mol/L}$.

2.9 Pengolahan dan Analisis Data

Seluruh data yang diperoleh dikelompokkan sesuai tujuan dan jenis data, kemudian dianalisis dengan metode statistik yang sesuai menggunakan SPSS versi 25.

1. Perhitungan statistik deskriptif yaitu nilai minimum, maksimum, *mean*, *median* dan standar deviasi untuk variabel data numerik.
2. Analisis bivariat diuji menggunakan uji statistik yang sesuai. Uji Kolmogorov-Smirnov untuk menilai normalitas data. Uji Spearman digunakan untuk mengetahui hubungan antara dua variabel. Hasil uji hipotesis disajikan dalam bentuk tabel, diagram dan narasi. Hasil uji hipotesis dinyatakan bermakna jika $p \leq 0,05$.

2.10 Skema Alur Penelitian

