

PERBANDINGAN METODE *IMMUNOASSAY* DAN *AFFINITY CHROMATOGRAPHY* DALAM PENGUKURAN KADAR HbA1C PADA PASIEN DIABETES MELITUS TIPE 2

Kevano¹, Ida Ayu Putri Wirawati², A A Wiradewi Lestari²

¹. Program Studi Sarjana Kedokteran dan Profesi Dokter, Fakultas Kedokteran Universitas Udayana

². Departemen Patologi Klinik, Fakultas Kedokteran Universitas Udayana/RSUP Sanglah Denpasar

e-mail : kevano.hasan@kanisius.org

ABSTRAK

Pada tahun 2019, sebanyak 7,9 juta penderita diabetes melitus tipe 2 di Indonesia merupakan penderita diabetes yang tidak terdiagnosis (73,7%). Salah satu penyebab terjadinya hal ini adalah kurangnya alat diagnosis diabetes melitus tipe 2 di fasilitas pelayanan kesehatan primer di Indonesia. Terdapat beberapa metode dalam pengukuran kadar HbA1c, salah satunya adalah metode *immunoassay* yang digunakan di RSUP Sanglah Denpasar. Metode yang mungkin menjadi alternatif adalah metode *affinity chromatography* yang bersifat POCT (*Point of Care Testing*). Penelitian ini bertujuan untuk membandingkan hasil ukur kadar HbA1c pada pasien diabetes melitus tipe 2 yang diukur dengan menggunakan metode *immunoassay* dan *affinity chromatography*. Penelitian ini adalah penelitian analitik dengan desain *cross sectional*. Sampel penelitian ini terdiri dari 25 pasien diabetes melitus tipe 2 yang menjalani pemeriksaan HbA1c di RSUP Sanglah Denpasar pada periode 12 Juli 2021 hingga 1 Oktober 2021 dan memenuhi kriteria inklusi. Sampel darah sisa setelah pengukuran kadar HbA1c dengan metode *immunoassay* di RSUP Sanglah Denpasar kemudian dibawa untuk diukur dengan metode *affinity chromatography* di Laboratorium Klinik Kimia Farma Denpasar. Uji statistik dilakukan dengan menggunakan metode *paired sample T-Test*. Hasil *paired sample T-Test* menunjukkan bahwa rerata kadar HbA1c metode *immunoassay* dan *affinity chromatography* tidak sama dengan perbedaan rerata sebesar 0,7760%, IK 95% 0,5058 – 1,0462%, $p = 0$. Terdapat perbedaan signifikan dalam kadar HbA1c pasien diabetes melitus tipe 2 yang diukur dengan menggunakan metode *immunoassay* dan *affinity chromatography*.

Kata Kunci : HbA1c., *Immunoassay*., *Affinity Chromatography*

ABSTRACT

In 2019, 7.9 million people with type 2 diabetes mellitus in Indonesia were undiagnosed diabetics (73.7%). One of the causes is the lack of diagnostic tools for type 2 diabetes mellitus in primary health care facilities in Indonesia. There are several methods for measuring HbA1c levels, one of which is the immunoassay method used at Sanglah Hospital, Denpasar. Another method that might be an alternative is the affinity chromatography method which is POCT (Point of Care Testing). This study aims to compare the results of HbA1c levels in patients with type 2 diabetes mellitus as measured using immunoassay and affinity chromatography methods. This research is an analytic study with a cross sectional design. The sample in this study consisted of 25 patients with type 2 diabetes mellitus who underwent HbA1c examination at Sanglah Hospital, Denpasar in the period 12 July 2021 to 1 October 2021 and met the inclusion criteria. The remaining blood samples after measuring HbA1c levels using the immunoassay method at Sanglah Hospital Denpasar were then taken to be measured by affinity chromatography method at the Kimia Farma Clinical Laboratory Denpasar. Statistical tests were carried out using the paired sample T-Test method. Paired sample T-Test result shows that the mean levels of HbA1c by immunoassay and affinity chromatography methods are not the same, with the mean difference 0.7760%, 95% CI 0.5058 to 1.0462%, $p = 0$ There is a significant difference in HbA1c levels in patients with type 2 diabetes mellitus as measured using immunoassay and affinity chromatography methods.

Keywords : HbA1c., *Immunoassay*., *Affinity Chromatography*

PENDAHULUAN

Diabetes melitus adalah sebuah kelompok penyakit gangguan metabolisme yang memiliki karakteristik utama yaitu tingginya kadar glukosa dalam darah dalam jangka waktu yang panjang. Diabetes melitus tipe 2 merupakan diabetes yang disebabkan karena pola hidup yang tidak sehat. Data dari *International Diabetes Federation* (IDF) mengungkapkan bahwa secara global, pada tahun 2019, terdapat 463 juta orang yang menderita diabetes melitus dengan prevalensi global sebesar 9,3%. Bahkan, angka ini diperkirakan akan meningkat pada tahun 2030 hingga mencapai 578,4 juta orang.¹

Di Indonesia sendiri, jumlah penderita diabetes melitus berada di angka 10.681.400 orang. Indonesia berada di peringkat ke 7 dari 10 negara dengan jumlah penderita diabetes terbanyak di dunia dan nomor 2 di regio pasifik barat.¹ Salah satu masalah kasus diabetes melitus di Indonesia, sebagaimana disampaikan oleh Direktur Pencegahan dan Pengendalian Penyakit Tidak Menular, Kementerian Kesehatan Republik Indonesia adalah terkait terdiagnosis dan tidak terdiagnosisnya penyakit tersebut. Hal ini bermakna bahwa seringkali terjadi kasus dimana penderita diabetes melitus baru mengetahui kondisi yang dimilikinya ketika sudah dalam tahap yang buruk dan mengakibatkan banyak komplikasi sehingga proses pengobatan akan semakin sulit dilakukan.

Data dari Riskesdas 2013 mengungkapkan bahwa dari jumlah penderita diabetes melitus tipe 2 di Indonesia, hanya 30,4% atau 3.706.236 orang yang terdiagnosis dan sisanya sebanyak 69,6% atau 8.485.329 orang merupakan penderita diabetes melitus yang tidak terdiagnosis.² Sejalan dengan itu, pada tahun 2019 negara Indonesia berdiri di peringkat 5 dari 10 negara di dunia dengan jumlah undiagnosed diabetes tertinggi di dunia. Sebanyak 7,9 juta penderita diabetes di Indonesia merupakan penderita diabetes yang tidak terdiagnosis dengan persentase sebesar 73,7%. Dilihat dari data IDF, persentase ini merupakan yang tertinggi di seluruh dunia.¹

Salah satu penyebab dari terjadinya kasus diabetes melitus yang tidak terdiagnosis adalah kurangnya kemampuan dan kecukupan alat diagnosis diabetes melitus pada fasilitas pelayanan kesehatan primer di Indonesia. Pengukuran HbA1c sebagai gold standard dalam diagnosis diabetes melitus seharusnya dapat dilakukan dengan mudah dan cepat di barisan terdepan pelayanan kesehatan di Indonesia.³ Berangkat dari masalah tersebut, penelitian ini ingin mencari metode pengukuran HbA1c yang bisa digunakan dengan mudah, murah, cepat, dan tepat sasaran dengan cara membandingkan metode-metode yang telah digunakan dalam pengukuran kadar HbA1c.

Pengukuran HbA1c terdiri dari berbagai metode. Namun, terdapat 2 konsep dari pengukuran kadar HbA1c yaitu konsep kimiawi dan konsep pemisahan (separasi). Konsep kimiawi dilakukan dengan prinsip reaksi antigen-antibodi dengan hemoglobin yang telah terglifikasi.

Sedangkan, konsep pemisahan atau separasi dilakukan dengan prinsip memisahkan hemoglobin yang telah terglifikasi dari hemoglobin yang tidak terglifikasi.⁴ Di dalam penelitian ini dilakukan perbandingan metode *immunoassay* yang berprinsip kimiawi dengan metode *affinity chromatography* yang berdasarkan prinsip pemisahan.

Metode *immunoassay* yang berprinsip kimiawi merupakan metode yang sudah sering digunakan. Metode *immunoassay* menggunakan antibodi anti-HbA1c yang akan mendeteksi gugusan valin dari N terminal dari rantai β hemoglobin yang telah terglifikasi. Generasi pertama dari *immunoassay* HbA1c merekognisi asam amino 4-10 pada rantai β hemoglobin A. Namun proses analisisnya terganggu oleh kehadiran hemoglobin jenis lain yaitu hemoglobin S (HbS) dan hemoglobin C (HbC). Interferensi dari HbS dan HbC mendorong dikembangkannya *immunoassay* HbA1c generasi kedua dan ketiga. Generasi ketiga *immunoassay* HbA1c menggunakan *epitope* dari antibodi yang digunakan untuk mendeteksi asam amino yang posisinya lebih dekat dengan gugusan valin dari N terminal dari rantai β hemoglobin A. Generasi yang lebih lanjut dari *immunoassay* ini meningkatkan akurasi dari penghitungan kadar HbA1c.⁵ Metode *immunoassay* dipilih sebagai salah satu variabel karena sudah memiliki riwayat penggunaan yang jelas dan diharapkan bisa menjadi standar perbandingan dengan metode kedua yaitu *affinity chromatography*.

Metode *affinity chromatography* sendiri merupakan teknik yang tergolong masih baru dan belum sering digunakan, namun memiliki kelebihan-kelebihan tertentu. Secara umum, prinsip kerja *affinity chromatography* menggunakan perbedaan kekuatan dari interaksi antara berbagai komponen. Kekuatan ini ditentukan dari afinitas antara sampel, ligan, dan bufer yang bekerja pada fase-fase tertentu dalam *affinity chromatography*. Fase tersebut adalah fase stasioner dan fase aktif. Sesuai prinsip di atas, pada *boronate affinity chromatography* asam boronat adalah matriks yang akan berikatan dengan kolom kromatografi. Asam boronat akan menjadi ligan yang memiliki afinitas dengan HbA1c. Saat sampel darah diinjeksikan dan melewati kolom kromatografi maka HbA1c akan bertahan dan terfiksasi pada kolom kromatografi, membuatnya terpisah dengan hemoglobin lain yang tidak terglifikasi. Setelah itu, HbA1c yang telah terikat pada asam boronat akan dielusi atau dipisahkan dengan cairan elusi yang sesuai. HbA1c murni yang didapatkan kemudian akan dihitung untuk menentukan kadar HbA1c.⁶ Metode *affinity chromatography* dipilih karena berdasarkan studi pustaka yang telah dilakukan, penggunaannya lebih mudah diaplikasikan (POCT), rendah interferensi, serta lebih cepat dan murah sehingga diharapkan mampu menjadi metode diagnosis HbA1c yang lebih baik guna meningkatkan kemampuan pelayanan dan penanganan diabetes melitus di Indonesia. Di dalam penelitian ini dilakukan perbandingan dari metode *immunoassay* dan *affinity chromatography* berdasarkan aspek hasil ukur kadar HbA1c.

BAHAN DAN METODE

Penelitian ini adalah penelitian analitik dengan desain *cross sectional*. Subyek dalam penelitian ini adalah pasien diabetes melitus tipe 2 yang menjalani pengukuran kadar HbA1c di RSUP Sanglah Denpasar pada periode 12 Juli 2021 – 1 Oktober 2021. Teknik pengumpulan sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah *consecutive sampling*. Besar sampel penelitian yang didapatkan dalam penelitian ini adalah 25 sampel.

Penelitian ini telah mendapatkan kelayakan etik dari Komisi Etik Penelitian Fakultas Kedokteran Universitas Udayana nomor 1472/UN 14.2.2.VII. 14/LT/2021, dan mendapatkan ijin penelitian dari RSUP Sanglah Denpasar nomor LB.02.01/XIV.2.2.1/22887/2021.

Penelitian dilakukan dengan mengambil sisa sampel darah (*Whole blood*) dari subyek yang melakukan pemeriksaan kadar HbA1c dengan metode *immunoassay* di RSUP Sanglah Denpasar. Sisa sampel darah yang disimpan dalam tabung EDTA tersebut kemudian dibawa ke Laboratorium Klinik Kimia Farma Denpasar untuk dilakukan pemeriksaan kadar HbA1c dengan menggunakan metode *affinity chromatography*. Sampel yang digunakan di Laboratorium Klinik Kimia Farma Denpasar adalah sampel sisa dari pemeriksaan di RSUP Sanglah Denpasar. Satuan kadar HbA1c yang digunakan dalam penelitian ini adalah % HbA1c (DCCT/NGSP).

Kriteria inklusi pada penelitian ini adalah pasien diabetes melitus tipe 2 yang menjalani pemeriksaan HbA1c dengan metode *immunoassay* di RSUP Sanglah Denpasar yang kemudian dilakukan pemeriksaan HbA1c dengan metode *affinity chromatography* di Laboratorium Klinik Kimia Farma Denpasar ; pasien yang berumur 18 tahun ke atas ; pasien rawat jalan; dan pasien dengan kadar HbA1c diatas 6,5%. Variabel bebas di dalam penelitian ini adalah metode *immunoassay* dan metode *affinity chromatography*. Variabel bebas ini mempengaruhi nilai dari variabel tergantung. Variabel tergantung di dalam penelitian ini adalah kadar HbA1c pada pasien diabetes melitus tipe 2.

Penelitian ini menggunakan alat *Abbot Alinity ci-series* dengan prinsip *immunoassay* yang berada di RSUP Sanglah Denpasar, alat *Epithod@616 HbA1c Test Kit* dengan prinsip *boronate affinity chromatography* yang berada di laboratorium klinik Kimia Farma Denpasar, tabung EDTA untuk sampel darah pasien, dan insulated thermal bag untuk penyimpanan dan transportasi sampel.

Pengolahan data dilakukan melalui proses *editing*, koding, dan tabulasi. Analisis data hasil ukur dilakukan dengan menggunakan *software IBM SPSS Statistics 26*. Hasil ukur masing-masing metode dilakukan uji normalitas. Setelah itu, rata-ratanya dibandingkan satu sama lain dengan menggunakan *paired sample T-test*.

HASIL

Tabel 1. Karakteristik subjek penelitian

Variabel		n(%)	Rerata (SB)
Jenis Kelamin	Laki-laki	14 (56%)	
	Perempuan	11 (44%)	
Umur			54,46 (13,5)

Subjek dalam penelitian ini berjumlah 25 pasien, terdiri dari 14 subjek laki-laki (56%) dan 11 subjek perempuan (44%). Rata-rata umur subjek penelitian adalah 54,46 dengan standar deviasi 13,5.

Hal ini sesuai dengan data dari Riskesdas 2018 yang menunjukkan bahwa di provinsi Bali angka prevalensi terjadinya diabetes melitus tipe 2 pada laki-laki lebih tinggi dari perempuan dengan perbandingan 1,35% terhadap 1,31%. Namun secara nasional di Indonesia, prevalensi terjadinya diabetes melitus tipe 2 pada perempuan lebih tinggi dari pada laki-laki dengan perbandingan 1,78% terhadap 1,21%. Rata-rata umur sampel pada penelitian ini juga sesuai dengan data Riskesdas 2018 bahwa kelompok umur 55-64 tahun memiliki prevalensi yang tertinggi yaitu 6,3%.⁷

Uji Normalitas

Uji statistik pada penelitian ini dilakukan dengan nilai Indeks Kepercayaan (IK) 95% dan nilai *Alpha* (α) 5%. Uji normalitas dilakukan menggunakan metode Shapiro-Wilk. Dari uji statistik didapatkan bahwa kedua kelompok data berdistribusi normal dengan nilai $p = 0,055$ untuk kelompok data *immunoassay* dan $p = 0,350$ untuk kelompok data *affinity chromatography*. Dengan data berdistribusi normal maka dapat dilakukan *paired sample T-test* pada kedua kelompok data tersebut.

Paired Sample T-Test

Dari uji statistik *paired sample T-test* didapatkan hasil bahwa perbedaan rerata kadar HbA1c kelompok *immunoassay* dan *affinity chromatography* adalah 0,7760%, IK 95% 0,5058 – 1,0462%, $p = 0$. Hasil uji statistik menunjukkan nilai p adalah 0 sehingga $p < \alpha$. Oleh karena itu, hipotesis awal bahwa hasil ukur kadar HbA1c metode *immunoassay* sama dengan metode *affinity chromatography* ditolak.

Penelitian menunjukkan bahwa secara statistik hasil ukur kadar HbA1c metode *immunoassay* dengan metode *affinity chromatography* berbeda signifikan dengan rerata metode *immunoassay* (9,5%) lebih besar dari metode *affinity chromatography* (8,7%).

Hasil penelitian ini sejalan dengan penelitian dari Treewatchareekorn yang membandingkan kedua metode tersebut dan mendapatkan hasil bahwa metode *immunoassay* cenderung memberikan hasil yang lebih tinggi terutama pada kadar HbA1c di atas 8,0%.⁸ Penelitian tentang perbandingan antara metode *immunoassay* dan *affinity chromatography* masih sangat kurang namun beberapa penelitian telah melakukan perbandingan antara masing-masing metode dengan metode high-performance liquid chromatography (HPLC). Penelitian dari Sutandra yang membandingkan metode *immunoassay* dengan metode HPLC dalam pengukuran kadar HbA1c mendapatkan hasil bahwa terdapat perbedaan signifikan antara metode *immunoassay* dan HPLC dengan $p < 0,001$.⁹ Sedangkan, penelitian dari Arsyani yang membandingkan metode *affinity chromatography* dengan metode HPLC dalam pengukuran kadar HbA1c pada pasien diabetes melitus tipe 2 menunjukkan bahwa tidak terdapat perbedaan signifikan antara metode *affinity chromatography* dan HPLC dengan nilai $p > 0,05$ atau $p > 0,05$.¹⁰

Perbedaan yang didapatkan dalam penelitian ini dapat menjadi signifikan secara klinis karena akan mempengaruhi keputusan untuk menegakkan diagnosis diabetes melitus tipe 2. Hal ini juga akan berpengaruh pada tatalaksana dan prognosis dari pasien. Sesuai kajian pustaka, diagnosis diabetes melitus tipe 2 akan ditegakkan apabila kadar HbA1c pasien melebihi 6,5%.

Tabel 2. Diagnosis Diabetes Melitus Tipe 2 dengan kadar HbA1c pasien melebihi 6,5%.

Nomor data	Kadar HbA1c (%)	
	Immunoassay	Affinity chromatography
2	7,5	6
7	6,8	5,7
19	7	5

PEMBAHASAN

Dari data yang didapatkan selama penelitian, terdapat 3 buah data yang memiliki perbedaan signifikan secara klinis. Pada tabel 2 Pembahasan Data, dapat dilihat bahwa sampel data nomor 2, 7, dan 19 dapat didiagnosis diabetes melitus tipe 2 apabila menggunakan metode *immunoassay* (kadar HbA1c diatas 6,5%). Namun pada sampel yang sama mungkin didapatkan interpretasi yang berbeda apabila menggunakan metode *affinity chromatography* (kadar HbA1c dibawah 6,5%). Oleh karena itu dalam kasus seperti ini gejala klinis pasien juga penting dipertimbangkan dalam interpretasi hasil untuk menegakkan diagnosis. Baik secara statistik maupun secara klinis, perbedaan yang signifikan ini perlu diperhatikan oleh fasilitas pelayanan kesehatan yang

menggunakan metode *affinity chromatography* untuk mencegah tidak terdiagnosisnya pasien diabetes melitus tipe 2 (*false low*).

SIMPULAN DAN SARAN

Simpulan dalam penelitian ini adalah terdapat perbedaan signifikan dalam kadar HbA1c pasien diabetes melitus tipe 2 yang diukur dengan menggunakan metode *immunoassay* dan *affinity chromatography*.

Saran dalam penelitian ini adalah:

1. Fasilitas pelayanan kesehatan yang menggunakan metode *affinity chromatography* sebaiknya memperhatikan perbedaan yang signifikan ini dalam memutuskan diagnosis diabetes melitus tipe 2, terutama pada pasien dengan kadar HbA1c yang mendekati standard prediabetes (5,7% - 6,4%).

2. Sebaiknya dilakukan lebih banyak lagi penelitian dan perbandingan mengenai akurasi *affinity chromatography* dalam pengukuran kadar HbA1c karena metodenya yang berupa POCT (Point of Care Testing) dapat menjadi alternatif yang lebih cepat dan aksesibel di pelayanan kesehatan primer.

DAFTAR PUSTAKA

- International Diabetes Federation. IDF Diabetes Atlas, 9th edn. Brussels. Belgium: International Diabetes Federation. 2019.
- Riskesmas 2013. Pusat data dan informasi kementerian kesehatan Republik Indonesia. Kemenkes RI. 2013.
- Soewondo P, Ferrario A, dan Tahapary DL. Challenges in diabetes management in Indonesia: a literature review. *Globalization and health*, 9, 63. 2013.
- Weykamp C, John WG, Mosca A. A review of the challenge in measuring hemoglobin A1c. Belanda: Queen Beatrix Hospital, Queen Beatrixpark 1. 2009.
- Rhea JM., Koch D., Ritchie J. Unintended reporting of misleading HbA1c values when using assays incapable of detecting hemoglobin variants. *American Journal of Clinical Pathology*. 2013.
- Rhea JM, Ross M. Pathology consultation on HbA1c methods and interferences. *American Journal of Clinical Pathology*. 2014.
- Riskesmas 2018. Pusat data dan informasi kementerian kesehatan Republik Indonesia. Kemenkes RI. 2018.
- Treewatchareekorn M, Chaloeysup S. Comparative study of HbA1c level measurement by Turbidimetric Inhibition Immunoassay and Boronate Affinity HPLC at Vajira Hospital. Division of Clinical Chemistry and Immunology, Department of Central Laboratory, Faculty of Medicine Vajira Hospital, Navamindradhiraj University, Bangkok, Thailand. 2018.
- Sutandra S, Nurulita A, Arif M. Comparison of HbA1c level using Turbidimetry Inhibition Immunoassay, Latex Agglutination Inhibition Method and HPLC Method. *Indonesian Journal Of Clinical Pathology and Medical Laboratory*. 2018.

10. Arsyani S, Nasrul E, Rikarni., Prihandani T. Difference in HbA1c level Between Boronate Affinity and Ion Exchange-High Performace Liquid Chromatography method in diabetic patient. Indonesian Journal Of Clinical Pathology and Medical Laboratory. 2019.

