

## **BAB II**

### **TINJAUAN PUSTAKA**

#### **A. FAGOSITOSIS**

##### **1. Definisi**

Fagositosis merupakan proses dasar pada sistem imun dimana terjadi proses seluler dalam memakan dan menghilangkan partikel dengan ukuran kecil seperti mikroorganisme, benda asing dan sel sel yang mati yang sangat dibutuhkan untuk proses peradangan, perlindungan pejamu dan inisiasi respon imun bawaan dan adaptif [46–49].

##### **2. Jenis sel fagosit**

Proses fagositosis diperankan oleh sel fagosit yang terdiri dari granulosit seperti neutrophil, eosinophil, basophil, sel mast, monosit atau makrofag dan sel dendrit.

###### **a. Granulosit**

Neutrofil adalah sel granulosit yang paling banyak berperan dalam proses fagositosis. Neutrofil merupakan sel darah putih terbanyak (70-80%) yang memiliki lobus, ukuran 12-14  $\mu\text{m}$  diameter dan jumlah standar  $2,5-7,5 \times 10^9/\text{L}$ . Neutrofil diproduksi dan disimpan di sumsum tulang dan akan dikeluarkan dengan cepat pada saat proses infeksi, bersirkulasi dalam darah selama 6-10 jam, memiliki kemampuan melekat (*adherence*), motilitas dan daya fagositosis yang tinggi yang berasal dari amyloid dan akan hancur sendiri setelah *burst activity* [48].

Fungsi neutrofil meliputi kemampuan migrasi sel, fagositosis dan degranulasi patogen. Neutrofil mampu memakan patogen secara langsung. Neutrofil melakukan fagositosis dan membunuh patogen dengan cara mengeluarkan enzim granula dan molekul yang sangat toksin untuk membunuh patogen yang sudah dimakan. Aktivasi neutrofil menghasilkan *reactive oxygen species* (ROS), fagositosis dan membunuh bakteri yang mengarah ke pengendalian infeksi dan resolusi proses inflamasi [48,50].

Neutrofil yang teraktivasi merangsang NADPH oksidasi (NOX), merubah  $O_2$  menjadi superanion ( $O_2^-$ ), selanjutnya menjadi *hydrogen peroxidase* ( $H_2O_2$ ) dengan bantuan *myeloperoxidase* (MPO) menjadi *reactive oxygen species* (ROS). NOX juga merubah *nitric oxidase synthase* (NOS<sub>2</sub>) dengan merubah  $O_2$  menjadi *nitric okside* (NO) dan selanjutnya menjadi *reactive nitrogen species* (RNS). Dua komponen ini merupakan radikal bebas yang digunakan sebagai pertahanan karena dapat membunuh patogen [51]. Proses membunuh patogen membutuhkan banyak oksigen yang dapat menyebabkan *respiratory burst*. Granula dalam neutrophil mengeluarkan protein dan enzim yang membantu membunuh patogen infeksi yang membuat neutrofil dapat menghambat pertumbuhan dan penyebaran patogen.

b. Monosit/ Makrofag

Monosit berasal dari sumsum tulang dan bermigrasi ke sirkulasi perifer. Monosit memiliki kemampuan yang unik dimana selain mampu bermigrasi ke tempat peradangan, monosit juga mampu berubah didalam jaringan menjadi

makrofag jaringan dan memiliki fungsi yang berbeda. Fungsi utama makrofag sebagai fagositosis dapat diperiksa dengan menggunakan makrofag peritoneal. Makrofag jaringan memiliki banyak fungsi antara lain sebagai fagositik dan membunuh mikroba atau benda asing, mengaktifkan limfosit dengan cara mempresentasikan antigen/ *antigen presenting cells* (APC), mengeluarkan dan merangsang produksi sitokin, memodulasi respon imun humoral dan melakukan organisasi kembali pada jaringan yang mengalami peradangan serta menghasilkan faktor sitotoksik untuk mencegah terjadinya tumor.

Makrofag dibagi menjadi tiga jenis yaitu 1) Makrofag tipe 1 yang teraktivasi secara klasik menghasilkan mediator proinflamasi untuk meningkatkan limfosit T dalam perlindungan terhadap bakteri dan virus, 2) makrofag tipe 1 yang teraktivasi secara alternatif, 3) makrofag tipe 2 yang diaktifkan dan banyak berperan dalam pengendalian parasit, penyembuhan luka dan perbaikan jaringan. Ketiga jenis makrofag ini diaktifkan oleh sitokin yang berbeda dan setelah diaktifkan akan menghasilkan jenis dan fungsi sitokin dan kemokin yang berbeda juga. Proses ini terjadi dengan cara kerja yang sangat kompleks. Fagositosis makrofag didorong oleh glikolisis dan membutuhkan kehadiran glukosa ekstraseluler [52,53].

c. Sel Dendrit

Sel dendrit memiliki fungsi yang hampir sama dengan makrofag, selain berfungsi sebagai fagositosis juga dapat berperan sebagai presentasi antigen.

### 3. Proses Fagositosis

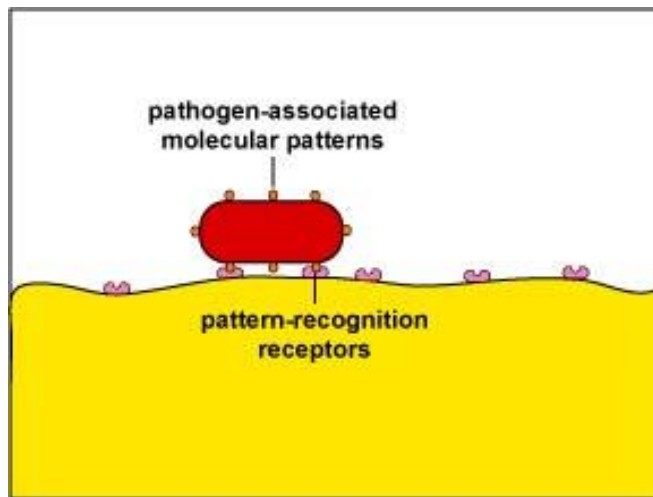
Proses fagositosis merupakan proses yang terjadi secara kompleks (**Gambar 3**) dalam memakan dan menghilangkan patogen sehingga mampu mempertahankan homeostasis jaringan [47]. Makrofag dapat melakukan proses fagositosis terhadap antigen secara langsung dan tidak langsung dengan aktivasi makrofag yang dibantu oleh sitokin yang disekresi oleh sel T pembantu. dan kemokin. Sitokin interferon gamma (IFN- $\gamma$ ) merupakan sitokn yang paling kuat mengaktifkan makrofag. [54]. Proses fagositosis dibagi dalam 4 langkah yang dijelaskan sebagai berikut:

a. Pengaktifan sel fagosit dan pengenalan (*Recognition*)

Pengaktifan dan pengenalan antigen merupakan tahapan pertama dalam proses fagositosis, dimana sel fagosit mendeteksi adanya mikroorganisme atau benda asing. Pengaktifan sel fagosit yang istirahat dilakukan oleh produk bakteri seperti protein bakteri, kapsul, LPS, peptidoglikan, asam teikoat, protein komplemen, sitokin inflamasi dan prostaglandin. Sel fagosit yang diaktivasi menghasilkan glikoprotein pada permukaan sel fagosit dan meningkatkan kemampuan sel fagosit melewati kapiler dan menuju ke tempat infeksi atau cedera.

Proses pengenalan dibantu oleh reseptor yang ada di membran sel seperti *toll like receptor* (TLRs) dan *G-protein receptors*, selanjutnya mengaktifkan sel fagosit dan memodulasi terjadinya ikatan antigen dengan sel fagosit. berikatan dengan *pathogen associated molecular patterns* (PAMPs). (**Gambar 1**) [46,47,55]. Makrofag yang terangsang oleh antigen atau peradangan akan mengeluarkan sitokin seperti tumor necrosis factor (TNF), interleukin (IL) 1,

IL-6, IL-8 dan IL-12. Makrofag juga mengeluarkan kemokin leukotrien, prostaglandin dan komplemen. [54].

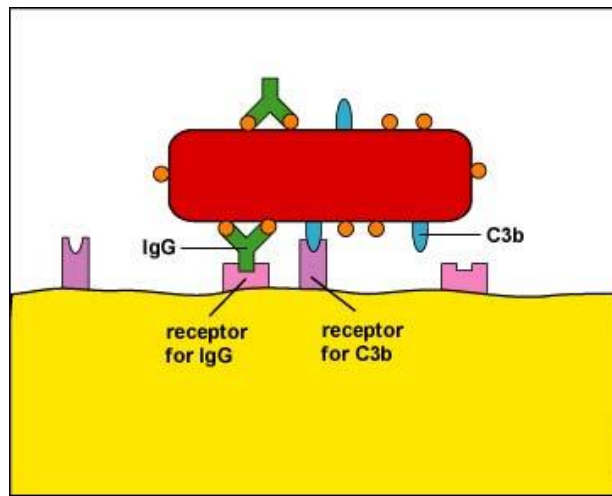


**Gambar 1. Proses pengenalan antigen** [46,47,55].

Kemampuan sel fagosit mengenal antigen dengan bantuan reseptor di permukaan sel (PRRs) yang dapat memodulasi ikatan dengan molekul di permukaan antigen (PAMPs).

b. Kemotaksis dan perlekatan (*binding*)

Proses **kemotaksis** sel fagosit dilakukan karena memiliki sifat amuboid dan dapat membuat formasi pseudopodia, membuat sel dapat bergerak cepat mengikuti bentuk celah yang dilewati untuk bermigrasi, mencari dan menangkap patogen. Reseptor yang membantu sel fagosit mendeteksi patogen adalah interleukin-8 (IL-8), interferon gamma (IFN- $\gamma$ ), C3a, C5a, IgG (**Gambar 2**) [55], dan leukotrien B4. Reseptor lain yang membantu sel fagosit mendeteksi dan melekat pada endothelium adalah kemokin dan lektin.



**Gambar 2. Proses perlekatan antigen dan sel fagosit opsonisasi [55]**  
 Proses perlekatan terjadi dimana protein permukaan bakteri berikatan dengan sel fagosit melakukan opsonisasi dengan bantuan antibodi dan komplemen.

Kemampuan sel fagosit melakukan perlekatan dengan patogen dibantu oleh *chemokine receptor* CXCR1 dan CXCR2 yang berikatan dengan *chemokine (C-X-C) ligan 8 (CXCL8)*. Perlekatan sel fagosit ke endotel mikrovaskuler banyak dibantu sitokin, interleukin-1 (IL-1) dan *tumor necrosis factor alfa (TNF- $\alpha$ )*, serta bakteri lipopolisakarida (LPS). Proses ini membutuhkan waktu yang lebih lama. Proses perlekatan dengan respon yang lebih cepat adalah glikoprotein Mac-1, LFA-1, p150,95 (CD11 / CD18) yang dibantu *peptida chemotactic (fMLP, C5a)*. *Endothelial leucocyte adhesion molecule-1 (ELAM-1)* dan *intracellular adhesion molecule-1 (ICAM-1)* merupakan molekul adhesi yang diinduksi pada permukaan endotelium, sebagai respon terhadap aktivasi sitokin. ICAM-1 merupakan ligan untuk LFA-1 (CD11a / CD18), dengan demikian CD11 / CD18 memainkan peran sentral dalam perlekatan sel fagosit terhadap endotel yang dirangsang oleh faktor kemotaksis atau sitokin [49].

Selanjutnya sel fagosit neutrophil yang berinteraksi dengan LPS atau IL-8 menghasilkan *neutrophil extracellular traps* (NETs) yang berikatan dengan antigen dan mencegah penyebaran antigen ke ekstrasel serta membunuh patogen tersebut.

c. Menelan (*Ingestion*)

Proses menelan terjadi karena filamen aktin mengirimkan pseudopoda dan menelan antigen, kemudian meletakkannya di dalam fagosom. Proses pompa elektron membawa proton (H<sup>+</sup>) ke dalam fagosom membuat kondisi menjadi sangat asam (pH 3,5 - 4,0) sehingga ketika lisosom menyatu dengan fagosom, kondisi asam ini mampu memecah protein seluler. Pengasaman juga melepaskan defensin, *cathelicidin*, dan *bacterial permeability inducing protein* (BPI) peptida dan enzim yang dapat membunuh patogen [46,47,55].

d. Pembunuhan (*Killing*) dan destruksi

Fagosit mengandung lisosom yang diproduksi oleh Aparatus Golgi yang mengandung berbagai enzim pencernaan, bahan kimia mikrobisida, dan radikal oksigen beracun. Lisosom menyatu dengan fagosom yang disebut dengan fagolisosom yang mengandung mikroba yang tertelan dan mikroba yang rusak. Kemampuan sel fagosit membunuh bakteri dapat dilakukan dengan 2 cara yaitu:

1) Membunuh dengan menggunakan oksigen

Sel fagosit membunuh patogen dengan menghasilkan *reactive oxygen species* (ROS). Aktivasi sel fagosit neutrophil dan makrofag menghasilkan ROS, fagositosis dan membunuh bakteri yang mengarah ke pengendalian infeksi dan resolusi proses inflamasi [48,50]. Fagosit yang teraktivasi

merangsang NADPH oksidasi (NOX), merubah  $O_2$  menjadi superanion ( $O_2^-$ ), selanjutnya menjadi *hydrogen peroxidase* ( $H_2O_2$ ) dengan bantuan *myeloperoxidase* (MPO) menjadi *reactive oxygen species* (ROS). NOX juga merubah *nitric oxidase synthase* (NOS<sub>2</sub>) dengan merubah  $O_2$  menjadi *nitric okside* (NO) dan selanjutnya menjadi *reactive nitrogen species* (RNS). Dua komponen ini merupakan radikal bebas yang sangat mikrobisida karena merupakan oksidator kuat yang mengoksidasi sebagian besar gugus kimia yang ditemukan dalam protein, enzim, karbohidrat, DNA, dan lipid. Oksidasi lipid dapat memecah membran sitoplasma yang digunakan sebagai pertahanan karena dapat membunuh patogen [51].

Oksidase juga bertindak sebagai pompa elektron yang membawa proton ( $H^+$ ) ke dalam fagosom. Ini menurunkan pH di dalam fagosom sehingga ketika lisosom menyatu dengan fagosom, pH sangat asam dan efektif memecah protein seluler. Proses membunuh patogen juga membutuhkan banyak oksigen yang dapat menyebabkan *respiratory burst* dan membuat fagosit dapat menghambat pertumbuhan dan penyebaran patogen.

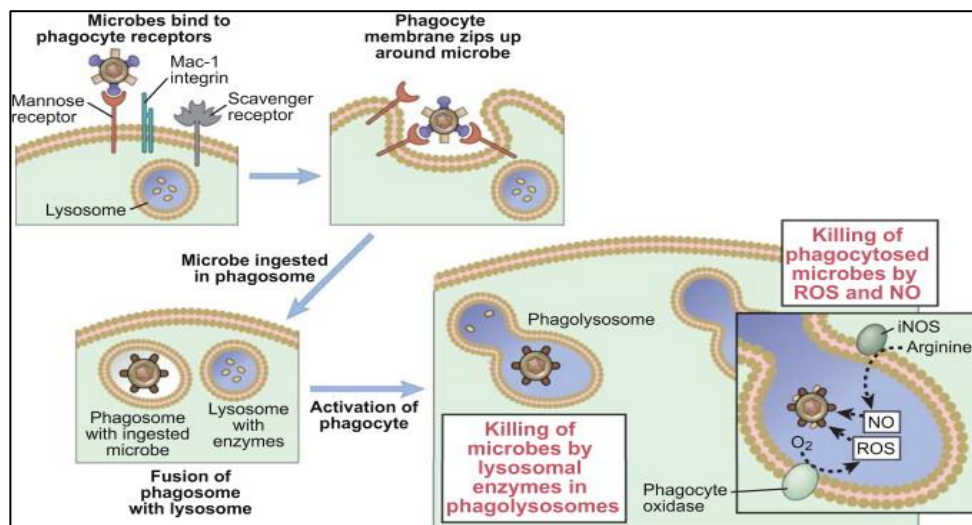
## 2) Membunuh tanpa menggunakan oksigen

Sel Fagosit dapat membunuh patogen tanpa menggunakan oksigen. Sel fagosit membunuh dengan menggunakan enzim-enzim dan protein yang ada di lisosom. Beberapa lisosom mengandung defensin seperti 1) peptide kationik yang dapat mengubah membran sitoplasma, 2) lisozim yaitu enzim yang memecah peptidoglikan, 3) laktoferin sebagai protein yang menghilangkan zat besi yang dibutuhkan bakteri, 4) cathepsin G, sebagi



protease yang menyebabkan kerusakan pada membran mikroba, 5) elastase sebagai protease yang membunuh banyak jenis bakteri, 6) *cathelicidins* sebagai protein yang setelah dibelah secara langsung menjadi racun bagi berbagai mikroorganisme, 7) protein penginduksi permeabilitas bakterisida (BPI), 8) protein yang digunakan oleh neutrofil untuk membunuh bakteri tertentu dengan merusak membrannya, 9) kolagenase, 10) dan berbagai enzim pencernaan lainnya yang menunjukkan aktivitas antimikroba dengan memecah protein, RNA, senyawa fosfat, lipid, dan karbohidrat [46,47,55].

Proses fagositosis merupakan proses yang terjadi secara kompleks dengan melibatkan sel fagosit, reseptor, sitokin, kemokin maupun enzim seperti terlihat pada **Gambar 3** [53].



**Gambar 3. Proses fagositosis** [53].

Proses yang dimulai dengan melakukan pengenalan dan pengikatan antigen dengan bantuan reseptor di permukaan membran sel makrofag, memakan antigen dengan merubah bentuk sel fagosit sesuai dengan bentuk antigen dan bergerak secara amuboid, membunuh antigen dengan 2 cara yaitu menghasilkan ROS dan NO serta penggunaan enzim-enzim di dalam fagolisosom.

## **Faktor yang mempengaruhi fungsi fagositosis**

Kemampuan sel fagosit melakukan fungsinya dipengaruhi oleh faktor intrinsik dan ekstrinsik yang dijelaskan dibawah ini:

### **a. Faktor intrinsik**

Faktor intrinsik yang mempengaruhi fungsi fagositosis adalah semua faktor yang berasal dari sel fagosit sendiri dan mengakibatkan kerusakan kemampuan untuk membunuh bakteri, yaitu : 1) Faktor penyakit seperti penyakit granulomatous, *Job's syndrome (Hiperimmunoglobulin-E Syndrome)*, *Chediak Higashi Syndrom*, defisiensi adhesi leukosit, 2) defisiensi MPO, 3) gangguan glukosa 6 fosfat dehidrogenase ( G6PD ) [53]

### **b. Faktor ekstrinsik**

Faktor ekstrinsik merupakan faktor lain yang mengganggu fungsi fagositosis yaitu : 1) Gangguan opsonisasi karena kurangnya komplemen dan antibody. Setelah proses pengenalan antigen selesai, limfosit T melepaskan sitokin yang mengaktifkan sel B untuk menghasilkan antibody yang spesifik untuk antigen. 2) penggunaan obat atau agen immunosupresan seperti kortikosteroid, 3) disfungsi atau ketidakadekuatan komplemen dan menghambat proses kemotaksis [53].

## **B. Gangguan Fungsi Fagositosis Pada Diabetes Melitus**

Sistem imun yang paling banyak terganggu adalah imun alamiah atau bawaan. Imun humoral tidak terlalu berpengaruh karena imun humoral saat diberi imunisasi memberi respon yang hampir sama dengan orang yang tidak menderita DM [2]. Sistem imun

pasien DM ditemukan mengalami gangguan pada fungsi fagositosis, dimana indeks dan aktifitas fagositosis menurun [10,56].

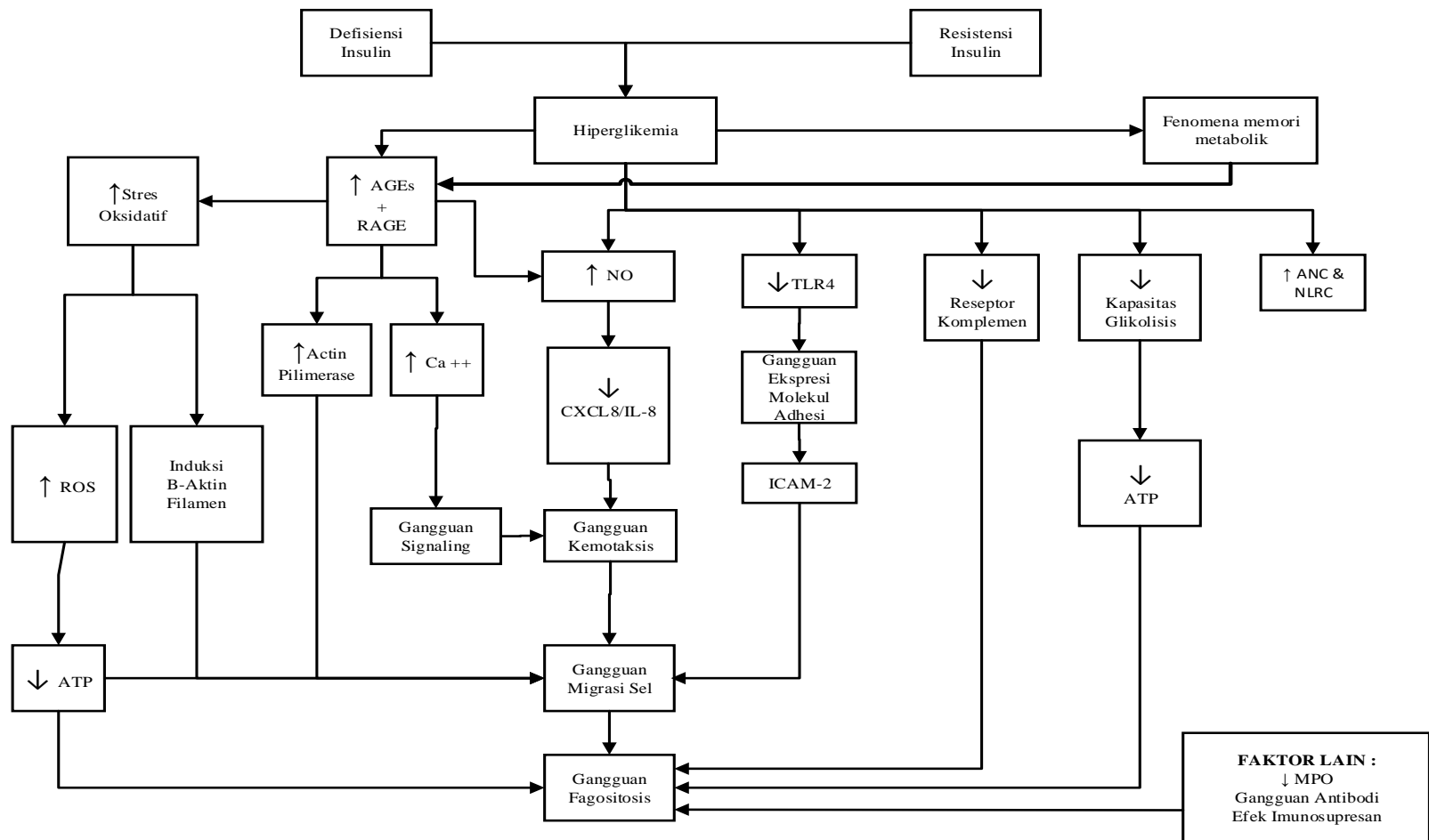
Peningkatan gula darah yang kronis tidak mempengaruhi diferensiasi makrofag di sumsum tulang, namun fungsinya terganggu [10]. Kemampuan fagositosis menurun akibat penurunan energi yang dibutuhkan sel fagosit karena hiperglikemia, penurunan limfosit T, depresi sistem antioksidan, gangguan imun humoral, komplikasi mikro dan makroangiopati dan banyaknya intervensi pengobatan pada pasien DM. Infeksi tidak hanya karena hiperglikemia tetapi juga berhubungan dengan stres oksidatif [57].

Kerusakan fungsi fagositosis pada pasien DM diperantarai hiperglikemia dan kontrol glukosa darah yang buruk [6], serta terbentuknya AGEs. Peningkatan produk AGEs yang berikatan dengan reseptor AGEs ( RAGE ) membuat disfungsi sel fagosit [58]. Jumlah makrofag dan neutrofil pasien DM lebih tinggi dibandingkan dengan non diabetes [11]. Peningkatan jumlah tersebut dipengaruhi oleh peningkatan sitokin pro inflamasi TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  dan CRP [59]. Gangguan migrasi disebabkan penurunan CXCL8/ IL-8 , peningkatan stres oksidatif dan peningkatan konsentrasi gula darah membuat peningkatan perlekatan monosit dan neutrofil ke endotel dan memperlambat jalan sel fagosit ke tempat infeksi [2].

Peningkatan AGEs akibat hiperglikemia kronik berdampak terhadap fungsi kemotaksis. AGEs akan meningkatkan calcium bebas intrasel dan aktin polimerisasi melalui induksi fMLP dan glikasi albumin [60], sehingga peningkatan pembentukan AGEs akan mengurangi kemampuan fungsi kemotaksis sel fagosit [2]. Hiperglikemia meningkatkan kadar *nitric oxidase* (NO) serum dan menghambat CXCL8/IL-8 in vitro juga menghambat kemotaksis dan aktivitas migrasi monosit dan neutrofil [2].

Peningkatan konsentrasi gula dalam darah mengganggu fungsi fagositosis dan daya bunuh granulosit terhadap antigen[5,6,8]. Hiperglikemia meningkatkan konsentrasi calcium intraselluler dan menurunkan kadar ATP, sehingga energi sel fagosit berkurang dalam melakukan aktivitas fagositosis [2]. Peningkatan produksi sitokin pro inflamasi selama kondisi hiperglikemia akan meningkatkan ROS meskipun tidak dilakukan stimulus lipo polisakarida (LPS). Hiperglikemia yang persisten meningkatkan ROS yang berhubungan erat dengan pembentukan AGEs. Pembentukan ROS melalui jalur NOX diperlukan untuk proses fagositosis dan membunuh bakteri [9], namun jumlah yang tidak seimbang akan menimbulkan stres oksidatif dan mengakibatkan kerusakan oksidatif dan timbulnya komplikasi [2].

Gangguan fagositosis pada DM juga terjadi karena penurunan reseptor komplemen (CRs) [61], penurunan kapasitas glikolisis [10], perubahan morfologi dan fungsi makrofag [62]. Kontrol glikemik yang baik akan meningkatkan fungsi fagositosis [6], namun beberapa penelitian masih ada yang mengatakan bahwa meskipun gula darah terkontrol atau nilai HbA1c turun, ternyata kemampuan kemotaksis, *adherence* dan fagositosis masih tetap terganggu [2], hal ini terjadi karena adanya fenomena memori metabolik, dimana dampak hiperglikemia terus berlanjut meskipun gula darah sudah terkontrol [16]. Peningkatan kadar gula darah yang sudah lama di derita pasien DM akan membentuk AGEs, dan menginduksi peningkatan cytokine TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 dan IL-8, tetapi menurun dengan pemberian stimulus LPS yang berdampak terhadap daya bunuh sel fagosit terhadap patogen [2]. Penjelasan mekanisme gangguan fungsi fagositosis pada pasien DM terangkum dalam **Gambar 4**.



Gambar 4. Mekanisme gangguan fungsi fagositosis diabetes melitus [2].

### **C. Dampak gangguan fungsi fagositosis pada DM tipe 2**

Fungsi fagositosis pasien DM tipe 2 terganggu, karena disebabkan hiperglikemia akibat defisiensi insulin dan resistensi insulin. Hiperglikemia sangat berkaitan dengan proses peradangan akut dan kerentanan terhadap infeksi, sehingga pasien DM lebih rentan mengalami infeksi dibandingkan yang tidak mengalami DM [8,63,64]. Infeksi tidak hanya karena hiperglikemia tetapi juga berhubungan dengan disfungsi endotel, inflamasi kronik dan stres oksidatif [57]. Hasil sistematik review mengatakan kejadian infeksi pada pasien DM lebih tinggi dibandingkan dengan bukan DM. Jenis infeksi yang sering terjadi adalah infeksi kulit sebesar 1,94 kali (CI 95% : 1,78-2,12), diikuti infeksi tidak spesifik 1,84 kali (CI 95% : 1,66–2,04), infeksi darah 1,72 kali (CI 95% : 1,48–2,00), infeksi saluran kemih 1,61 kali (CI 95% : 1,42 to 1,82) infeksi gastrointestinal 1,48 kali (CI 95% : 1,40-1,57) dan infeksi pernafasan 1,35 kali (CI 95% : 1,28 – 1,43) [65].

### **D. Stres Oksidatif Pada Pasien DM Tipe 2**

Stres oksidatif adalah suatu keadaan dimana terjadi peningkatan jumlah radikal bebas melebihi kapasitas kemampuan netralisasi antioksidan sehingga mengakibatkan ketidakseimbangan jumlah radikal bebas dengan antioksidan di dalam tubuh. Terdapat beberapa jalur yang menghubungkan stres oksidatif dengan keadaan hiperglikemia. Hiperglikemia tidak hanya membentuk ROS tetapi juga melemahkan mekanisme antioksidan endogen melalui glikasi dari enzim-enzim pengurai dan pengurangan antioksidan molekul rendah seperti glutathion.

## 1. *Reactive oxygen species* (ROS)

*Reactive Oxygen Species* ( ROS ) adalah radikal bebas yang terdiri dari oksigen, diproduksi oleh sel mamalia terutama fagosit, sebagai reaksi terhadap beberapa patogen mikroba. Molekul ini dihasilkan oleh aktivasi kompleks enzimatis *nikotinamida adenin dinukleotida fosfat* (NADPH) oksidase (NOX2) dan termasuk anion superoksida ( $O_2^-$ ), hidrogen peroksida ( $H_2O_2$ ), radikal hidroksil ( $\cdot OH$ ), peroksinitric ( $ONOO^-$ ), dan asam hipoklorit ( $-OCl$ ). ROS memainkan berbagai peran dalam inflamasi, pertahanan tubuh, dan homeostasis. Pembentukan ROS dapat berasal dari endogen dan eksogen. ROS yang diproduksi secara endogen berasal dari aktivitas metabolisme sel, sedangkan sumber eksogen berasal dari lingkungan seperti polusi, radiasi dan infeksi dari mikroorganisme.

Gangguan pengaturan reseptor selama stres oksidatif mengaktifasi mikroglia memproduksi sitokin proinflamasi untuk mendapatkan bentuk yang teraktivasi. Terdapat suatu hipotesis yang menyatakan bahwa peristiwa awal yang menyebabkan terjadinya stres oksidatif pada hiperglikemia adalah meningkatnya pembentukan ROS yang terjadi pada tingkat mitokondria, sebagai konsekuensi meningkatnya metabolisme glukosa intraseluler.

Pada kondisi normal terdapat keseimbangan untuk pertahanan dan stimuli anti inflamasi sedangkan pada kondisi hiperglikemia sistem pertahanan antioksidan intraseluler menurun, enzim-enzim yang bertanggung jawab dalam metabolisme sel berkurang sedangkan sitokin proinflamasi, kemokin dan respon selular meningkat. Proses-proses tersebut menyebabkan kerusakan pada tingkat makromolekul seperti

DNA, lipid, protein dan karbohidrat, terjadi gangguan pada homeostasis selular dan generasi dari ROS.

## **2. Nitric oksida ( NO )**

*Nitric Oksida* (NO) dianggap sebagai salah satu RNI terpenting dan diproduksi oleh mekanisme oksidatif yang melibatkan katabolisme L-arginin . Produksi NO oleh aksi enzimatik dari sintase oksida nitrat yang dapat diinduksi (iNOS) merupakan salah satu mekanisme mikrobisidal utama yang digunakan sel fagositik untuk melawan beberapa patogen . iNOS dapat diinduksi oleh beberapa rangsangan, termasuk IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , dan LPS, dan diekspresikan oleh sel imun seperti makrofag, neutrofil, sel dendritik, dan sel natural killer (NK). Fungsi NO terlibat dalam peradangan dan proses homeostasis.

Peningkatan stres oksidatif termasuk ROS dan NO pada pasien diabetes berkaitan dengan kondisi hiperglikemia yang merangsang pembentukan glikasi yaitu AGEs yang dapat memicu timbulnya penyakit-penyakit komplikasi diabetes, termasuk gangguan imunitas [2].

## **3. Advance glicemic end product (AGEs)**

*An advanced glycation end product* (AGEs) merupakan produk dari glukosa dan lisin atau arginin yang terbentuk dengan jalur *polyol pathway*. Proses ini merupakan salah satu jalur yang aktif pada hiperglikemia dan mempunyai efek sebagai proinflamasi dan prooksidan. Hiperglikemia dapat memicu inflamasi melalui peningkatan stres oksidatif dan induksi faktor transkripsi proinflamasi yaitu *nuclear factor kappa-B* (NF- $\kappa$ B).



Stres oksidatif dapat menyebabkan AGEs berinteraksi dengan reseptor spesifik yaitu *receptor for advanced glycation end product* (RAGE) dengan cara meningkatkan sintesisnya, selanjutnya RAGE menginduksi faktor transkripsional proinflamasi yaitu NF-kB untuk memproduksi sitokin proinflamasi seperti IL-6, *tumor necrosing factor* (TNF) dan interleukin 1 (IL-1). Sitokin ini dapat memediasi sintesis protein fase akut yang dapat menginisiasi dan mendukung proses inflamasi.

AGEs berikatan dengan reseptor pada banyak tipe sel, seperti sel endotel, monosit, makrofag, limfosit, dan sel mesangium. Pengikatan ini menimbulkan beragam aktivitas biologis, termasuk migrasi monosit, pengeluaran sitokin dan faktor pertumbuhan dari makrofag. AGEs sebagai senyawa oksigen reaktif yang diikat reseptor makrofag spesifik RAGE mengakibatkan peningkatan stres oksidatif yang menghambat migrasi monosit dan neutrophil [2].

AGEs pada pasien DM terbentuk secara endogen karena hiperglikemia, namun AGEs juga dapat terbentuk karena faktor diet yang meningkatkan ikatan glukosa dengan protein dan lemak akibat kesalahan dalam pengolahan makanan [58], tingginya pembentukan reseptor NF-kB dan penurunan reseptor AGER-1 yang berfungsi dalam degradasi AGEs dan adanya gangguan pada renal sebagai ekskresi AGEs.

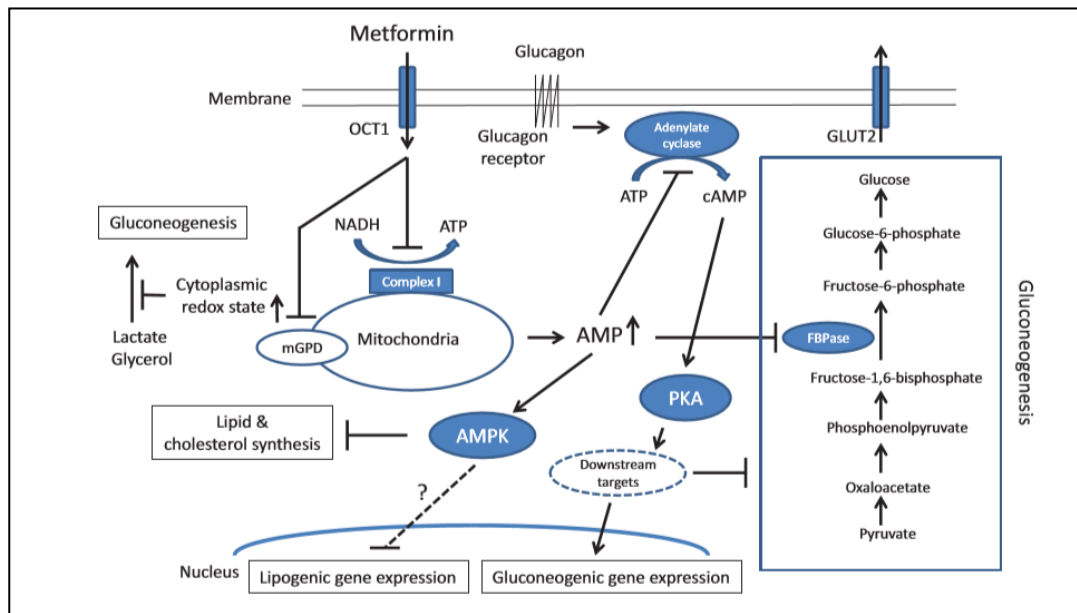
## **E. Metformin**

Metformin merupakan golongan obat hiperglikemia golongan biguanid. *American Diabetes Association* (ADA) merekomendasikan metformin sebagai obat hiperglikemia oral lini pertama pada pasien DM tipe 2 [17,20]. Penggunaan metformin mencapai 65% [66]. Dasar pemilihan terapi ini karena efek samping yang minimal dan keuntungan yang

lebih banyak dengan menurunkan HbA1c paling tinggi yaitu sebesar 1-2%, tidak menyebabkan hipoglikemia serta biaya paling rendah dibandingkan dengan obat hipoglikemik oral (OHO) lainnya [17,20].

Tujuan pemberian metformin tidak hanya menurunkan HbA1c saja, namun juga memperbaiki patogenesis DM termasuk gangguan imunitas pasien DM [20]. Peran insulin dalam imun dengan atau tidak melibatkan kontrol glikemik masih diperdebatkan, namun diduga insulin dapat meningkatkan migrasi dan kemotaksis monosit dan neutrofil [2].

Metformin bekerja dengan cara mengurangi pembentukan gula di hati dan menurunkan resistensi insulin [67]. Metformin mampu menurunkan gula darah akibat penurunan glukoneogenesis. Proses ini terjadi karena gangguan rantai pernafasan di mitokondria yang berdampak terhadap penurunan *adenosin trifosfat* (ATP), penurunan aktivitas siklus asam *citric* dan menghambat *glycerol-3-phosphate dehydrogenase* (GPD2). Penurunan glukoneogenesis juga terjadi karena pengaktifan aktivitas *adenosin monophosphate activated protein kinase* (AMPK) ( **Gambar 5**) [25,68].



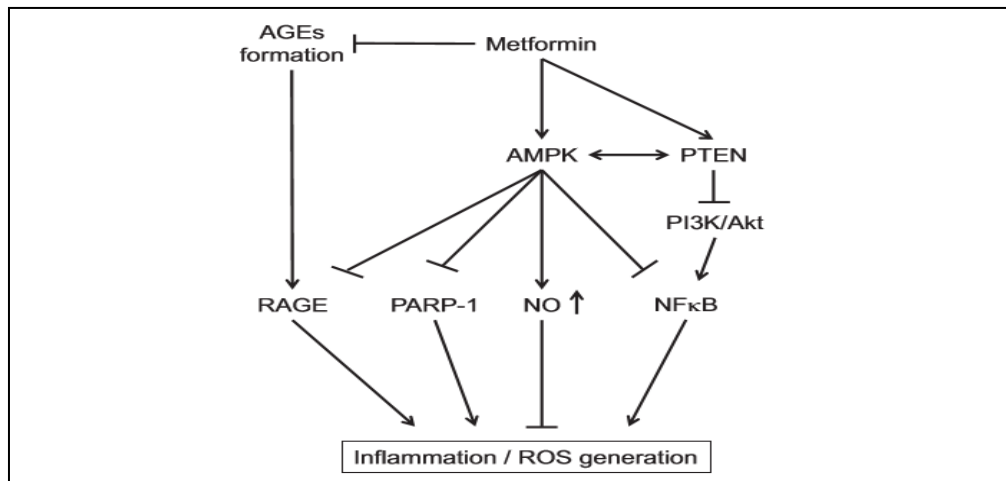
**Gambar 5. Mekanisme kerja metformin melalui jalur AMPK [25,68].** Penurunan glukoneogenesis di hati terjadi karena penurunan ATP dan pengaktifan AMPK berdampak terhadap penurunan gula darah.

Penurunan gula darah karena metformin juga membuat sel menerima karbon glukosa yang sedikit, menurunkan absorpsi glukosa di intestinal, meningkatkan pengambilan glukosa perifer, menurunkan kadar insulin puasa, meningkatkan sensitivitas insulin, dan menekan resistensi insulin dalam hati dan otot rangka. Pemberian metformin dapat mengurangi morbiditas dan mortalitas pada DM dengan menurunkan gula darah [69].

Metformin juga memiliki efek tidak langsung yaitu sebagai antiinflamasi dan antioksidan. Efek metformin sebagai imunomodulator memperbaiki inflamasi melalui aktivasi AMPK dan menghambat terbentuknya NF-κB sehingga terjadi penurunan sitokin pro inflamasi IL-1, IL-6, TNF-α dan CRP, memberi dampak terhadap penurunan infeksi dan peradangan pada DM [23,24,70,71].

Metformin sebagai antioksidan bekerja dengan cara mengaktifkan AMPK, menghambat faktor transkripsi NF-κB dan mengurangi stres oksidatif. Stres oksidatif berkurang

dengan cara menurunkan produksi NO [23], ROS [24], menghambat pembentukan endapan glikasi lanjut (AGEs) dan reseptor untuk ekspresi AGEs (RAGE) [25], (**Gambar 6**) dan meningkatkan antioksidan alami [21,22].



**Gambar 6. Mekanisme anti inflamasi metformin [25].**

Metformin secara tidak langsung dapat menurunkan proses inflamasi melalui jalur AMPK dan menghambat NF-kB

Pemberian metformin dosis tunggal efektif pada pasien DM dengan gula darah yang terkontrol yang dibuktikan dengan penurunan HbA1c. Pasien yang tetap memiliki nilai HbA1c yang tinggi membutuhkan dosis obat yang lebih tinggi sehingga beresiko mengalami putus obat karena efek samping penggunaan metformin, sehingga dianjurkan penggunaan kombinasi obat hipoglikemik.

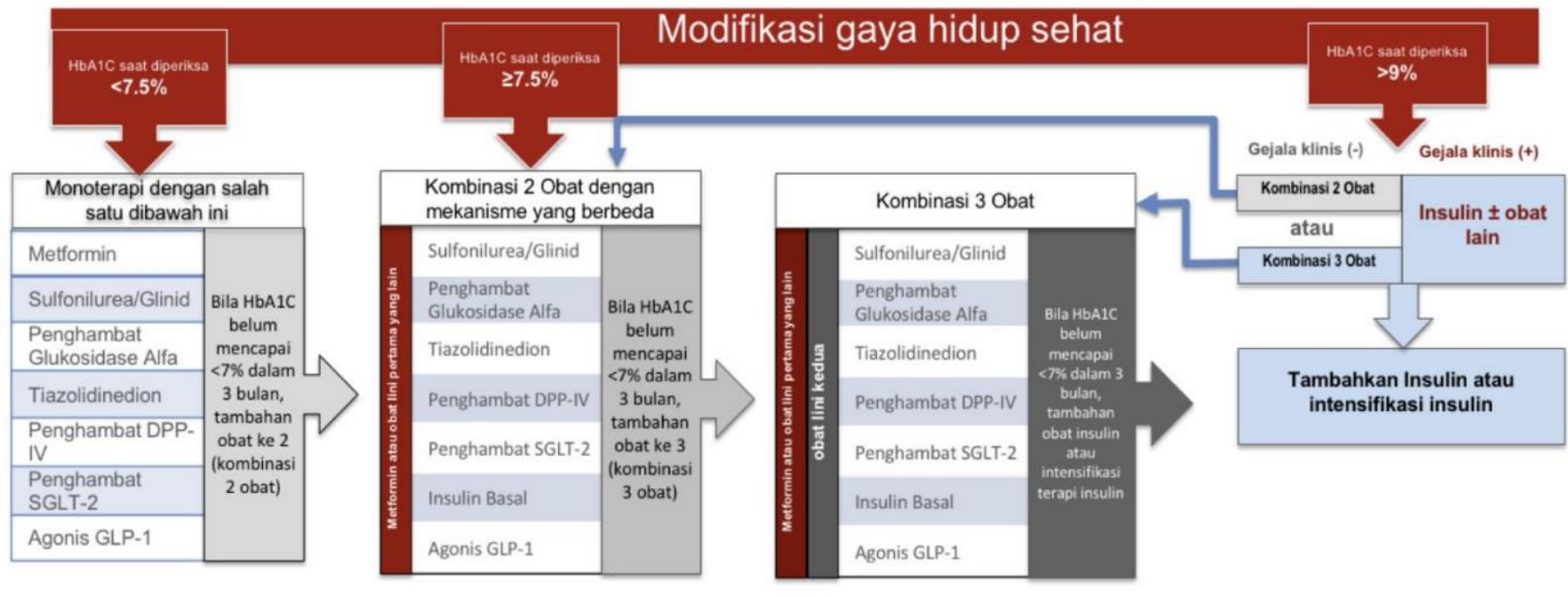
ADA membuat rekomendasi dalam penggunaan kombinasi obat hipoglikemik pasien DM tipe 2 sebagai berikut [17]:

- 1) Pilihan obat lini pertama adalah metformin dan dapat dilanjutkan apabila pasien tetap toleransi dan tidak ada efek samping yang bermakna.

- 2) Penggunaan kombinasi obat dengan metformin dapat dimulai sejak awal apabila ada kegagalan pengobatan.
- 3) Penggunaan insulin dapat dimulai apabila terjadi peningkatan katabolisme dengan kehilangan berat badan, terdapat gejala hiperglikemia atau kadar HbA1c 10% atau kadar glukosa darah lebih dari 300 mg/dl. Kadar HbA1c yang tinggi bukan alasan mutlak dalam memulai pemberian insulin disesuaikan pada masing masing individu, tergantung keadaan klinis pasien, kondisi ekonomi dan ketersediaan obat.
- 4) Proses dan pemilihan pengobatan tetap melibatkan pasien dengan mempertimbangkan adanya penyakit kardiovaskuler, efek terhadap berat badan, biaya serta adanya efek samping obat.

Pemilihan terapi kombinasi yang dianjurkan sesuai algoritma penanganan DM tipe 2 ( **Gambar 7**) adalah menggabungkan pengobatan lini awal metformin ditambah obat hipoglikemik dengan efek yang berbeda, namun apabila terdapat intoleransi dengan metformin, maka obat dapat digantikan dengan obat lain seperti sulfoniluria, *acarbose*, *thiazolidinedione*, penghambat DPP-4, penghambat SGLT-2 dan agonis GLP-1 [20]. Saat ini kombinasi yang paling banyak digunakan adalah metformin dan sulfoniluria dengan efek metformin meningkatkan sensitivitas insulin dan sulfoniluria meningkatkan produksi insulin. Manfaat yang didapat dari kombinasi ini adalah penggunaan dosis tidak terlalu banyak sehingga resiko gagal atau berhenti pengobatan dapat diminimalkan, meskipun efek samping kombinasi ini adalah hipoglikemia. Jika efek hipoglikemia lebih tinggi dapat dipertimbangkan dengan kombinasi metformin dengan TZD, penghambat DPP-4, penghambat SGLT-2 atau agonis GLP-1 [20]. Penjelasan terapi pengobatan

pasien DM tipe 2 dijelaskan pada gambar algoritma pengelolaan DM tipe 2. Penggunaan metformin yang lama memiliki efek samping menghambat penyerapan vitamin B12 sebanyak 113% yang berpengaruh terhadap hematopoiesis dan neuropati [72], pasien mengalami gangguan pencernaan sebanyak 25% yang menyebabkan mual dan diare [66], sehingga pasien tidak patuh terhadap pengobatan sebanyak 12,6% [73].



Gambar 7. Algoritma penggunaan pengelolaan DM Tipe 2 [20].

## **F. Ekstrak Likopen**

### **1. Struktur kimia dan sumber likopen**

Likopen merupakan golongan karotenoid. Likopen dengan persentasi terbanyak berasal dari tomat sebesar 80-90%. Likopen juga ditemukan pada buah dan sayuran berwarna merah, kuning dan orange, namun jumlahnya tidak sebanyak yang ada pada tomat. Likopen dengan rumus kimia  $C_{40}H_{56}$  memiliki struktur dengan rantai hidrokarbon yang lurus sebanyak 13, terdiri dari 11 ikatan rangkap terkonjugasi dan 2 tidak terkonjugasi (**Gambar 8**). Likopen dalam tomat segar memiliki struktur *trans*-isomer yang dapat berubah menjadi *cis*-isomer karena pengaruh lingkungan internal, namun untuk merubah likopen *cis* menjadi *trans* membutuhkan energi yang sangat banyak, sehingga struktur *trans*-isomer hampir memiliki kondisi yang stabil. Struktur *cis* isomer terdiri dari *5-cis*-, *9-cis*-, *13-cis*- and *15-cis*-, dan yang tinggi kemampuan antioksidannya adalah likopen *cis*-5 [42].

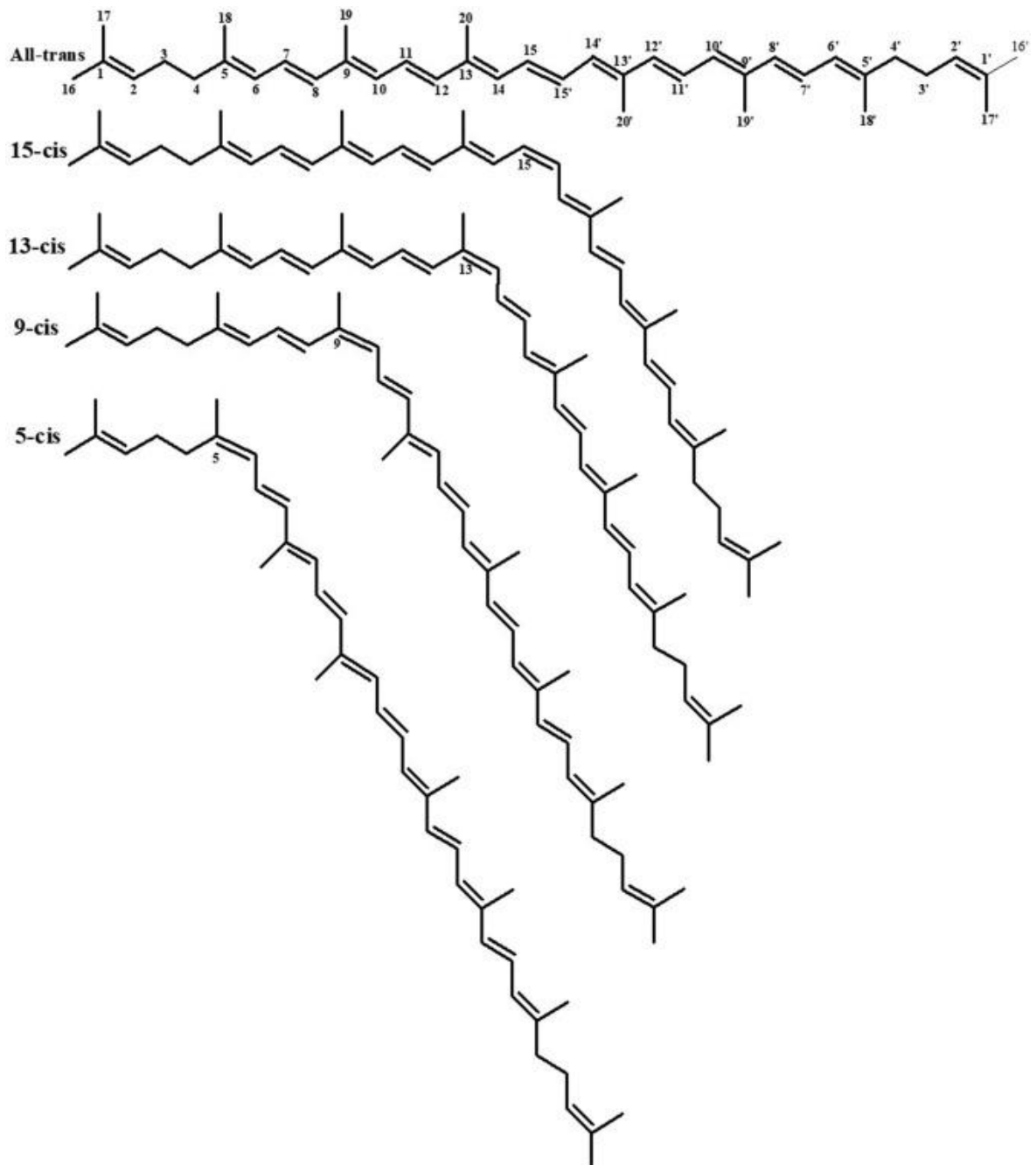
### **2. Bioaktivitas likopen**

#### **a. Aktivitas antioksidan**

Likopen merupakan antioksidan yang sangat kuat, memiliki struktur polyen dan dapat menyediakan elektron, sehingga likopen sangat reaktif terhadap oksigen dan radikal bebas [35,36], paling kuat diantara karotenoid lainnya ( $\alpha$  karoten,  $\beta$  karoten,  $\beta$  cryptoxanthin, lutein, zeaxanthin) , memiliki kemampuan menghilangkan radikal bebas 10 kali lebih baik dari tokoferol, 100 kali lebih



efektif dari vitamin E dan 125 kali lebih baik dari glutathione [34]. Sifat likopen yang hidrofobik membuat efektif dalam memperbaiki sel yang tidak dapat diperbaiki oleh vitamin C yang larut dalam air.



**Gambar 8. Struktur likopen** [42].

Struktur likopen memiliki rantai hidrokarbon lurus dengan 13 ikatan rangkap yang terdiri dari 11 terkonjugasi dan 2 tidak terkonjugasi [42].

Likopen memiliki 3 cara kerja dalam mengurangi ROS yaitu 1) merubah formasi :  $\text{Likopen} + \text{R}^* \rightarrow \text{R-Likopen}$ , 2) transfer elektron ke radikal bebas :  $\text{likopen} + \text{R}^* \rightarrow \text{likopen}^{*+} + \text{R}^-$ , dan 3) abstraksi hydrogen alilik :  $\text{likopen} + \text{R}^* \rightarrow \text{likopen}^* + \text{RH}$  [74].

Mekanisme kerja likopen terdiri dari dua jalur yaitu melalui jalur oksidatif dan non oksidatif ( **Gambar 9** ).

#### 1) Jalur Oksidatif

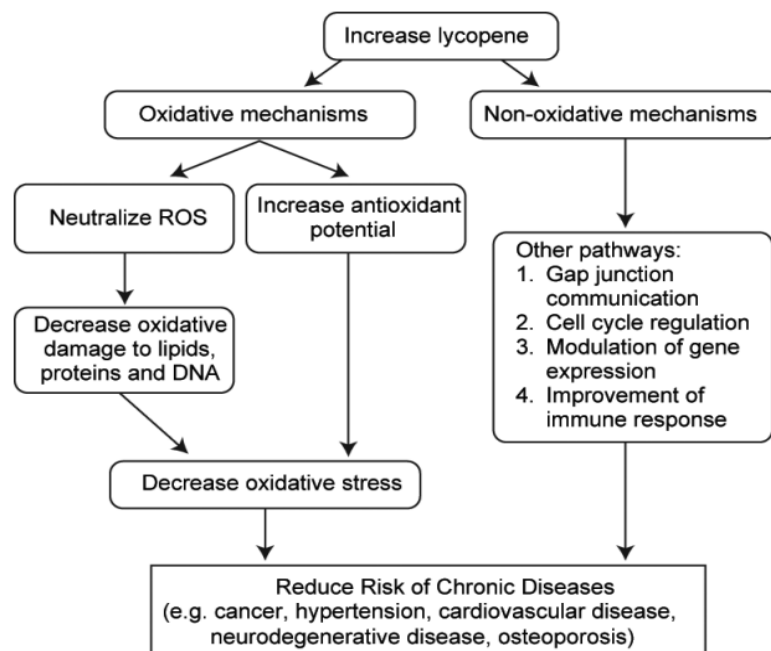
Peran likopen sebagai antioksidan melalui jalur oksidatif bekerja karena likopen memiliki 11 ikatan rangkap yang terkonjugasi yang mengandung banyak elektron, sehingga mampu menyumbangkan elektron ke radikal bebas, membuat radikal bebas lebih netral dan menghentikan reaksi propagasi berantai serta mencegah dampak kerusakan oksidatif pada lipid, protein dan DNA. Likopen mampu membekukan oksigen tunggal dan mampu bekerja dengan senyawa radikal bebas lain seperti hidrogen peroksida, nitrogen dioksida dan radikal hidroksil. Likopen dapat mengurangi peroksidasi lipid dengan bertindak sebagai antioksidan pemutus rantai yang baik, dalam bereaksi dengan radikal peroksil yang terbentuk pada fase propagasi dalam pembentukan radikal yang berpusat pada karbon. Radikal ini dapat bereaksi dengan mudah dan reversibel dengan oksigen untuk membentuk radikal peroksil pembawa rantai baru, yang sangat stabil daripada ROS. Likopen mampu menghambat produksi ROS pada makrofag, secara langsung oleh sifat antioksidannya, dan secara tidak langsung dengan kemampuannya dalam ekspresi NADPH, melawan efek iNOS dengan

menghambat produksi NO dan/atau dengan menurunkan *inducible nitric oxidase synthase* (iNOS) pada protein dan mRNA.

Likopen berfungsi sebagai anti inflamasi dan antioksidan yang baik karena kemampuan likopen mengatur AGEs/RAGE, pensinyalan *c-Jun* N-terminal kinases (JNK)/AMPK, *phosphatidylinositol-3-kinase* (PI3K)/Akt dan *Sirtuin type 1* (SIRT1)/ *Forkhead box protein O1* (FoxO1)/ *peroxisome proliferator-activated receptors* (PPARs) serta aktivitas *acetylcholine esterase* (AChE) [75], mampu mengontrol target molekuler yang sensitif terhadap redoks, mempengaruhi aktivitas dan ekspresi enzim dan memodulasi aktivasi AMPK dan faktor transkripsi, seperti NF- $\kappa$ B dan AP-1, Nrf2. Sejumlah penelitian menunjukkan bahwa AMPK sangat kuat diaktifkan oleh ROS dan likopen, sendiri atau dalam kombinasi dengan produk alami lainnya dan memodulasi AMPK fosforilasi. Efek antioksidan likopen dapat menurunkan stres oksidatif seperti MDA, peroksidasi lipid [32], dan NO<sub>2</sub> sehingga dapat mengurangi mortalitas pasien obstruksi paru [76]. Likopen juga dapat meningkatkan antioksidan enzimatik endogen *superoxide dismutase* (SOD), *catalase* (CAT) dan *glutathione peroxidase* (GPx) [32].

## 2) Jalur non oksidatif

Mekanisme non oksidatif likopen dapat membantu komunikasi *gap junction*, memodulasi ekspresi gen mengatur siklus sel dan meningkatkan sistem imunitas dengan meningkatkan fungsi fagositosis makrofag [31].



**Gambar 9. Mekanisme kerja likopen [77].**

Likopen bekerja melalui jalur oksidatif dengan menurunkan stres oksidatif dan jalur non oksidatif melalui pengaturan sel dan respon imun sehingga mampu menurunkan resiko penyakit-penyakit kronis.

## **b. Antidiabetik**

Likopen sebagai antidiabetes dapat mengatur metabolisme glikolipid, mencegah resistensi insulin, peradangan dan akumulasi lemak [41], meningkatkan sensitivitas insulin melalui peningkatan regulasi reseptor insulin dan reseptor *insulin-like growth factor-1* (IGF-1), PI3K, dan ekspresi protein Akt terfosforilasi di hipokampus dan korteks serebral tikus resisten insulin serta penghambatan ekspresi *signal transducer of activation* (STAT3) di hati [78]. Peningkatan konsumsi likopen mampu memperbaiki patofisiologi DM tipe 2 dimana status glikemia menjadi baik dengan menurunkan gula darah puasa dan HbA1c [40]. Likopen mampu mengurangi efek samping dan toksisitas obat

konvensional, meningkatkan proses hematopoiesis akibat pemberian metformin [3] dan memproteksi kerusakan hepar [79]. Likopen dapat mengurangi glikasi yang berkelanjutan dengan menghambat atau mengurangi produksi AGEs serta menghambat ikatan AGEs dengan RAGE [39,80].

### **c. Imunomodulator**

Likopen sudah banyak diteliti sebagai imunomodulator pada pasien diabetes melitus. Likopen mampu melindungi sel fagosit dari kerusakan oksidatif sehingga dapat meningkatkan imunitas baik alami maupun buatan. Melalui jalur MAPK, likopen dapat menurunkan NF-kB sebagai pencetus timbulnya sitokin proinflamasi IL-1, IL-6 dan TNF-a, serta mencegah apoptosis makrofag [42]. Likopen juga memperbaiki status imun dengan cara meningkatkan sel darah putih dan limfosit, menurunkan jumlah neutrofil, limfosit dan rasio neutrofil [3]. Likopen dapat meningkatkan jumlah NO makrofag dan peningkatan aktivitas makrofag [31].

### **d. Anti kanker**

Likopen memiliki kemampuan meningkatkan respon antioksidan pada sel prostat, menghambat proliferasi sel dan menurunkan kapasitas metastasis sel kanker pada prostat [36], menghambat metastasis sel kanker ovarium pada tikus dan menurunkan penanda kanker CA125 pada kanker ovarium, dan mencegah pertumbuhan sel tumor pada kanker kolon [36,42,81].

### **3. Pencernaan, penyerapan, metabolisme dan transportasi**

Proses pencernaan dan penyerapan likopen melibatkan organ di mulut, lambung dan usus halus dengan urutan sebagai berikut : 1) Mulai dari mulut dengan bantuan mekanisme mekanik, enzim pencernaan membantu melepaskan likopen dari substrat makanan, 2) proses di lambung terjadi hidrolisis likopen yang terlarut dalam minyak dengan bantuan asam dan enzim lambung yaitu enzim peptase, amylase dan lipase, 3) likopen di usus halus yang terlarut dalam lemak bergabung menjadi micella dengan bantuan *myxoid*, SR-BI dan CD 36, 4) penyerapan likopen oleh epitel usus halus yang dimediasi  $\beta$ -carotene 15,15'-monooxygenase (BCOM1) dan  $\beta$ -carotene 9',10'-dioxygenase (BCO2) menjadi kilomikron. Apolipoprotein membantu transpor likopen kilomikron ke vena porta dan sirkulasi limfe dan dialirkan ke semua organ. Kestabilan dan bioaktivitas likopen sangat dipengaruhi oleh ukuran makanan, enzim pencernaan, asam lambung, dan proses emulsi dan miselisasi lemak.

### **4. Faktor yang mempengaruhi *bioavailability* likopen**

*Bioavailability* likopen dipengaruhi 1) panas, dapat membuat perubahan bentuk likopen trans menjadi cis dan mempengaruhi fungsi, 2) pencahayaan, dimana oksidasi fotosintetasi akan menginduksi degradasi oksidatif dan isomerase likopen, 3) kondisi asam, molekul keratinoid membentuk intermediet ion karbenium (CH1) yang dapat menginduksi konversi likopen trans menjadi cis, 4) bahan metal, menginduksi degradasi oksidatif likopen

## 5. Dosis

Likopen yang digunakan dalam studi *in vivo* pada hewan coba tidak memiliki toksisitas [82], serta toleransi yang tinggi sehingga penggunaan suplemen likopen aman [74]. Penggunaan dosis likopen sangat beragam dan tidak ada dosis likopen yang ideal dikonsumsi setiap hari [83]. Dosis likopen yang digunakan pada penelitian hewan coba dimulai dari dosis rendah 1, 2, dan 4 mg/kg bb, namun dosis yang memberikan efek positif terhadap sitokin proinflamasi dan faktor transkripsi dimulai dengan dosis 4 mg/kg, penggunaan likopen dengan obat diabetes gibenklamid justru menghambat penurunan glukosa darah pada tikus DM hingga hari ke 14 [33].

Dosis lain yang banyak digunakan adalah 10, 20, 40, 45 dan 50 mg/kg [3,28,32,41,80]. Penggunaan likopen pada pasien DM dimulai dengan dosis 4, 10, 20, 40 dan 45 mg/kg, dari semua dosis tersebut yang paling banyak memberikan efek positif adalah dosis 20 mg/kg dan ini adalah dosis yang disarankan untuk dikonsumsi setiap hari [83]. Likopen dengan dosis yang beragam pada DM memberikan makna terhadap penurunan stres oksidatif (lipid peroksidasi dan MDA) [32,41], meningkatkan enzim antioksidan GPx, SOD dan CAT [32], menurunkan ekspresi faktor transkripsi NF-kB dan RAGE [33,80], memperbaiki sistem hematologi dan imunitas dengan meningkatkan Hb, albumin, globulin, menurunkan jumlah neutrofil, dan rasio limfosit neutrophil [3].

Kemurnian likopen dari ekstrak buah tomat 80-98%. Jumlah ekstraksi likopen pada industri menggunakan kemurnian likopen 5 – 12%. Pemberian ekstrak likopen 10,13% dengan dosis 45 mg/dl selama 35 hari pada penderita DM tipe 2 dapat menurunkan stres oksidatif seperti AGEs [28].

Durasi penggunaan likopen juga bervariasi mulai dari 7 hari hingga 12 minggu dengan dosis yang beragam juga, dan durasi yang paling sering digunakan dalam penelitian hewan coba yang mengalami DM adalah 28 hari. Penggunaan likopen harus disesuaikan dengan dosis dan durasi penggunaan. Dosis likopen yang dapat memperbaiki fenomena memori metabolik yang sudah dilakukan adalah dosis 45 mg/kg dengan durasi 35 hari [28].

## **6. Efek samping**

Likopen tidak beracun dan umumnya ditemukan dalam makanan, tetapi kasus asupan karotenoid berlebihan telah dilaporkan menyebabkan perubahan warna pada kulit yang dikenal sebagai likopenodermia dan tidak beracun. Kasus intoleransi atau reaksi alergi terhadap likopen makanan, yang dapat menyebabkan diare, mual, sakit perut atau kram, penumpukan gas, muntah, dan kehilangan nafsu makan pernah dilaporkan [84].

## **G. Gula darah**

Parameter yang digunakan untuk pemeriksaan gula darah adalah gula darah sewaktu, gula darah puasa, gula darah post prandial, tes toleransi glukosa oral (TTGO) dan glukosa terglukosilasi yaitu hemoglobin terglukosilasi (HbA1c) atau albumin terglukosilasi / *glycated albumin* (GA) [20]. Pembentukan HbA1c terjadi karena adanya ikatan glukosa non enzimatis dengan hemoglobin yang bersifat *irreversible*.



Kondisi gula darah pada pasien DM dapat berfluktuasi dan meningkatkan kadar HbA1c [85]. HbA1c merupakan parameter yang baik dalam menilai kontrol gula darah dan mampu melihat rerata glukosa darah dalam 2-3 bulan pada manusia dan 60 hari pada tikus [86]. Hasil *systematic review* dan meta analisis mengatakan peningkatan kadar gula darah memiliki korelasi yang kuat dengan kadar HbA1c ( $r = 0,61 - 0,68$ ). Semakin tinggi gula darah maupun adanya fluktuasi gula darah maka HbA1c juga semakin tinggi. Gula darah 2 jam PP lebih kuat hubungannya dengan HbA1c bila dibandingkan dengan gula darah puasa [87].

HbA1c dapat digunakan untuk menegakkan diagnosis DM, mengevaluasi program terapi yang telah dilaksanakan, serta membuat perbaikan dalam terapi DM. HbA1c dapat digunakan untuk menilai target pengobatan DM tipe 2 [88]. Terapi yang diberikan pada pasien DM tipe 2 bertujuan untuk menurunkan gula darah, membuat gula darah terkontrol serta mencegah komplikasi akibat peningkatan gula darah yang persisten [17,20]. Pemberian likopen memiliki dampak terhadap HbA1c. Studi epidemiologis mengatakan konsumsi likopen dapat menurunkan kadar HbA1c [40].

Pemeriksaan HbA1c pada hewan coba (tikus) berbeda dengan manusia, karena dipengaruhi oleh eritrosit, dimana umur eritrosit manusia dan binatang berbeda. Umur eritrosit manusia adalah 120 hari, sedangkan umur eritrosit tikus 60 hari [86]. Penggunaan parameter HbA1c lebih baik dari pemeriksaan glukosa yang lain karena pasien lebih nyaman, tidak perlu puasa, preanalisis lebih stabil karena tidak dipengaruhi oleh stres, diet maupun penyakit. ADA merekomendasikan diagnosis DM menggunakan pemeriksaan HbA1c metode yang tersertifikasi *national glycohemoglobin standardization program* (NGSP) dan *cut off* HbA1c  $\geq 6,5\%$  [17].