

BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Diabetes Melitus Tipe 2 (DMT2) merupakan salah satu masalah kesehatan global yang prevalensinya terus meningkat setiap tahun. Berdasarkan data International Diabetes Federation (IDF) tahun 2021, sekitar 536,6 juta orang di dunia menderita diabetes, dan angka ini diprediksi akan melonjak menjadi 783,2 juta pada tahun 2045. Indonesia menempati peringkat kelima di dunia dengan jumlah penderita diabetes mencapai 19,5 juta orang, yang diproyeksikan meningkat menjadi 28,6 juta pada tahun 2045. Peningkatan ini disebabkan oleh pola hidup tidak sehat, obesitas, dan kurangnya aktivitas fisik, yang memperburuk kondisi resistensi insulin dan inflamasi kronis (IDF, 2021).

Diabetes Melitus Tipe 2 ditandai dengan hiperglikemia kronis yang disebabkan oleh kombinasi resistensi insulin dan disfungsi sel beta pankreas. Kondisi ini sering kali diikuti oleh komplikasi makrovaskular dan mikrovaskular, termasuk aterosklerosis, nefropati, dan retinopati, yang memperburuk morbiditas dan mortalitas pasien. Salah satu mekanisme utama yang memediasi komplikasi ini adalah inflamasi kronis yang dipicu oleh stres oksidatif, pelepasan sitokin proinflamasi, dan disfungsi endotel (ADA, 2023).

Soluble CD40L adalah protein proinflamasi yang dilepaskan oleh trombosit yang teraktivasi dan berinteraksi dengan reseptor CD40 pada sel target, seperti endotel, makrofag, dan sel beta pankreas. Interaksi ini memicu kaskade sinyal yang menginduksi ekspresi molekul adhesi, produksi sitokin inflamasi, dan peningkatan stres oksidatif, yang semuanya berkontribusi pada resistensi insulin dan progresivitas DMT2 (Kurniawan., 2016)

Kadar sCD40L yang tinggi telah dikaitkan dengan kontrol glikemik yang buruk, yang diukur melalui kadar HbA1c dan glukosa darah puasa. Pasien dengan kontrol glikemik yang tidak terkontrol memiliki kadar sCD40L yang lebih tinggi dibandingkan dengan mereka yang memiliki kontrol glikemik terkontrol. Hal ini menunjukkan bahwa sCD40L tidak hanya mencerminkan inflamasi sistemik, tetapi juga berpotensi sebagai indikator non-invasif untuk menilai efektivitas pengelolaan glikemik pada pasien DMT2 (Lim et al., 2004)

Penelitian ini layak dilakukan mengingat prevalensi DMT2 yang tinggi dan dampaknya yang signifikan terhadap morbiditas dan mortalitas. Dengan memahami mekanisme inflamasi yang mendasari DMT2, penelitian ini diharapkan dapat berkontribusi pada pengembangan strategi pencegahan dan pengelolaan yang lebih efektif. Inflamasi kronis telah terbukti memainkan peran kunci dalam patogenesis DMT2 dan komplikasinya. Oleh karena itu, analisis sCD40L sebagai biomarker inflamasi dapat memberikan wawasan baru tentang keterkaitan antara inflamasi dan

kontrol glikemik.

Indikator kontrol glikemik yang digunakan secara luas adalah HbA1c, namun parameter ini tidak mencerminkan inflamasi sistemik (Kurniawan, 2024). Oleh sebab itu, sCD40L memiliki potensi sebagai biomarker tambahan yang dapat melengkapi evaluasi klinis, terutama untuk mengidentifikasi pasien dengan risiko komplikasi lebih tinggi. Jalur sinyal CD40–CD40L telah diidentifikasi sebagai target potensial untuk intervensi terapeutik. Studi ini dapat menjadi landasan untuk pengembangan terapi berbasis penghambatan CD40L yang lebih efektif dalam mengendalikan inflamasi dan memperbaiki kontrol glikemik.

Di Indonesia, di mana prevalensi DMT2 sangat tinggi, penelitian ini menjadi relevan karena dapat membantu memahami dinamika inflamasi yang terjadi pada populasi lokal. Hasil dari penelitian ini diharapkan mampu mendukung program skrining dan intervensi dini yang lebih efektif di tingkat nasional. Lebih dari itu, sCD40L juga berpotensi sebagai prediktor risiko komplikasi jangka panjang, seperti aterosklerosis dan penyakit kardiovaskular. Pengukuran kadar sCD40L dapat membantu dokter dalam menyesuaikan terapi berdasarkan profil inflamasi individu pasien, sehingga meningkatkan kualitas pengelolaan DMT2.

1.1.1 Diabetes Melitus Tipe 2

Diabetes Melitus Tipe 2 (DMT2) merupakan suatu kondisi metabolik kronis yang ditandai dengan hiperglikemia akibat gangguan sekresi insulin, resistensi insulin, atau kombinasi keduanya (Care & Suppl, 2022). Gangguan ini terjadi ketika efektivitas insulin dalam memfasilitasi pengambilan glukosa oleh sel-sel tubuh menurun, sehingga glukosa menumpuk dalam darah. *American Diabetes Association* (ADA) menambahkan bahwa DMT2 merupakan penyakit progresif yang disebabkan oleh kelainan pada fungsi sel beta pankreas dan sensitivitas insulin di jaringan perifer yang akhirnya berkontribusi pada hiperglikemia kronis dan komplikasi metabolik jangka panjang (ADA, 2023).

Faktor risiko Diabetes Melitus Tipe 2 (DMT2) dapat dibagi menjadi dua kategori utama, yaitu *modifiable risk factors* (faktor risiko yang dapat dimodifikasi) dan *non-modifiable risk factors* (faktor risiko yang tidak dapat dimodifikasi). Faktor risiko yang dapat dimodifikasi mencakup aspek yang dapat diubah atau dikendalikan melalui intervensi gaya hidup dan medis. Salah satu faktor utama adalah obesitas atau overweight, khususnya akumulasi lemak di area abdomen. Pola makan yang buruk, seperti konsumsi makanan tinggi lemak, gula, dan kalori tetapi rendah serat, kurang aktivitas fisik atau gaya hidup, hipertensi, kebiasaan merokok dan penggunaan obat-obatan tertentu, seperti glukokortikoid, antipsikotik, dan diuretik, yang dapat memicu hiperglikemia dan resistensi insulin melalui gangguan metabolisme glukosa. Faktor risiko yang tidak dapat dimodifikasi mencakup aspek yang tidak bisa diubah, tetapi penting untuk diidentifikasi agar dapat mendeteksi individu yang memiliki risiko tinggi terkena DMT2. Genetik, riwayat keluarga, etnisitas atau ras, usia yang lebih tua (>45 tahun), riwayat diabetes gestasional pada

wanita selama kehamilan (Lankatillake et al., 2019).

Patofisiologi Diabetes Melitus Tipe 2 (DMT2) diawali dengan terjadinya resistensi insulin. Resistensi insulin adalah kondisi di mana efektivitas insulin dalam merangsang pengambilan glukosa oleh jaringan perifer, terutama otot rangka dan jaringan adiposa, mengalami penurunan. Pada kondisi ini, reseptor insulin di permukaan sel mengalami desensitisasi atau penurunan sensitivitas terhadap sinyal insulin, akibatnya proses transpor glukosa melalui protein transporter GLUT-4 di membran sel terganggu, sehingga glukosa menumpuk dalam sirkulasi darah. Selain itu, resistensi insulin juga mengganggu metabolisme lipid dan meningkatkan proses lipolisis, yang kemudian memperburuk keadaan inflamasi sistemik dan memperkuat resistensi insulin melalui peningkatan kadar asam lemak bebas dalam darah (Galicia-garcia et al., 2020).

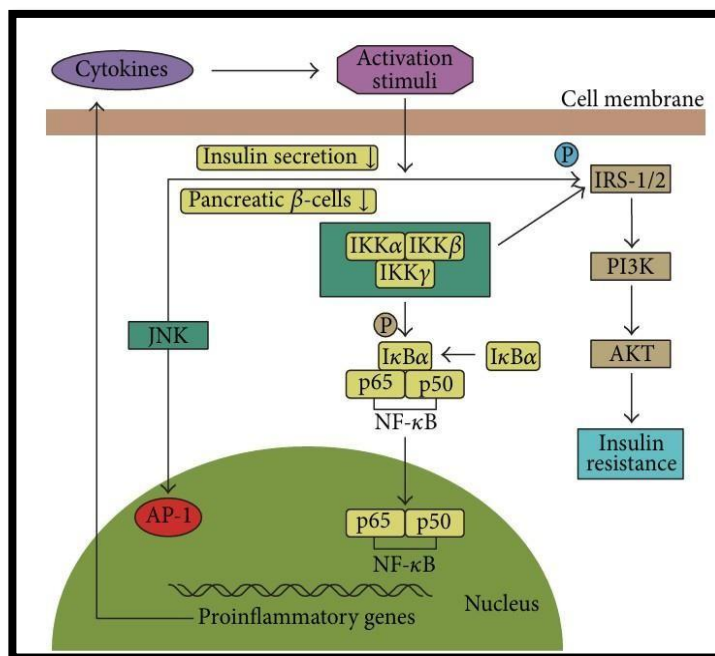
Sel beta pankreas berusaha mengkompensasi dengan meningkatkan produksi dan sekresi insulin sebagai respons terhadap resistensi insulin. Mekanisme kompensasi ini bertujuan untuk mengatasi ketidakmampuan jaringan perifer dalam memanfaatkan glukosa. Pada tahap awal, kompensasi ini masih mampu menjaga kadar glukosa darah dalam kisaran normal, namun beban kerja yang terus-menerus pada sel beta menyebabkan stres seluler yang akhirnya mengakibatkan disfungsi dan kelelahan sel beta akibat glukotoksitas dan lipotoksitas (Galicia-garcia et al., 2020).

Kompensasi yang tidak memadai menyebabkan kerusakan progresif pada sel beta pankreas seiring berjalannya waktu. Proses ini melibatkan stres oksidatif, aktivasi sitokin proinflamasi, dan akumulasi produk akhir glikasi lanjut atau *Advanced Glycation End Products* (AGEs) yang mempercepat apoptosis sel beta. Selain itu, infiltrasi makrofag dan respon inflamasi di jaringan pankreas memperburuk kerusakan sel beta, sehingga kapasitas sekresi insulin semakin menurun (Galicia-garcia et al., 2020). Resistensi insulin pada patofisiologi DMT2 memicu serangkaian perubahan metabolik yang menyebabkan gangguan keseimbangan homeostasis energi dan metabolisme glukosa. Pada kondisi ini, jaringan adiposa berperan sebagai sumber utama inflamasi kronis karena mengalami peningkatan pelepasan asam lemak bebas (*Free Fatty Acids*, FFA) ke dalam sirkulasi darah. Akumulasi FFA di jaringan perifer berkontribusi pada lipotoksitas yang memperburuk resistensi insulin dengan mengganggu jalur sinyal insulin di tingkat seluler. Selain itu, pelepasan FFA yang berlebihan juga merangsang infiltrasi makrofag dan aktivasi sel imun lainnya di jaringan adiposa (Burhans et al., 2019).

Aktivasi sel imun memicu pelepasan berbagai sitokin proinflamasi, seperti tumor necrosis factor-alpha (TNF- α), interleukin-6 (IL-6), dan interleukin-1 β (IL-1 β) yang memperburuk resistensi insulin melalui gangguan pada transduksi sinyal insulin di reseptor insulin dan protein substrat insulin (IRS-1). TNF- α , misalnya, menginduksi fosforilasi serin pada IRS-1 yang menghambat aktivasi jalur

phosphoinositide 3-kinase (PI3K) dan Akt, sehingga mengurangi translokasi transporter glukosa (GLUT-4) ke membran sel. Akibatnya, pengambilan glukosa oleh sel menjadi terganggu, menyebabkan hiperglikemia yang berkelanjutan. Selain itu, IL-6 dan IL-1 β juga meningkatkan inflamasi sistemik dengan merangsang produksi protein C-reaktif (CRP) dan menginduksi stres oksidatif yang memperburuk kerusakan jaringan (Chen et al., 2015).

Inflamasi kronis yang berkelanjutan menciptakan lingkaran umpan balik positif yang memperparah resistensi insulin dan meningkatkan stres oksidatif di jaringan pankreas (Gambar 1). Pada pankreas, stres oksidatif merangsang apoptosis dan disfungsi sel beta, yang menyebabkan penurunan sekresi insulin secara progresif. Proses ini diperparah oleh akumulasi produk akhir glikasi lanjut *Advanced Glycation End Products* (AGEs) yang berinteraksi dengan *Receptor for AGEs* (RAGE) dan memicu aktivasi jalur pensinyalan inflamasi seperti NF- κ B. Aktivasi ini memperkuat ekspresi sitokin proinflamasi dan enzim prooksidan, yang mempercepat kerusakan sel beta pankreas dan memperburuk hiperglikemia (Chen et al., 2015).



Gambar 1. Jalur inflamasi yang menghubungkan peradangan dengan resistensi insulin melalui aktivasi jalur JNK dan NF κ B (Sumber:Chen et al., 2015)

Seiring waktu, kombinasi antara resistensi insulin, disfungsi sel beta, dan inflamasi kronis menciptakan kondisi glukotoksisitas dan lipotoksisitas yang memperburuk metabolisme glukosa. Hiperglikemia kronis ini kemudian memperkuat proses inflamasi melalui peningkatan pelepasan reaktif oksigen (ROS) dan aktivasi jalur inflamasi yang merusak integritas pembuluh darah dan jaringan perifer. Akibatnya, pasien DMT2 tidak hanya mengalami gangguan kontrol glikemik, tetapi juga memiliki risiko tinggi mengalami komplikasi mikrovaskular seperti nefropati, retinopati, dan neuropati, serta komplikasi makrovaskular seperti aterosklerosis dan penyakit kardiovaskular (Lytrivi et al., 2020).

Parameter kontrol glikemik merupakan indikator penting yang digunakan untuk menilai kadar glukosa darah dan efektivitas pengelolaan diabetes melitus, khususnya DMT2. Parameter yang lebih stabil dan jangka panjang adalah HbA1c, yang merepresentasikan kadar glukosa rata-rata selama 2-3 bulan terakhir. Nilai HbA1c $\leq 6,5\%$ dianjurkan sebagai target untuk pasien dengan kontrol glikemik yang baik, sedangkan nilai di atas batas tersebut menandakan perlunya intervensi tambahan dalam terapi diabetes (Samson et al., 2023).

Definisi diabetes melitus yang terkendali baik adalah apabila kadar glukosa darah, kadar lipid, dan HbA1c mencapai kadar yang diharapkan, serta status gizi maupun tekanan darah sesuai target yang ditentukan (Tabel 1). Khusus parameter kontrol glikemik HbA1c dianggap terkontrol apabila kadarnya berada di bawah 7% untuk sebagian besar pasien dewasa dan untuk pasien usia lanjut, target HbA1c antara 7,5 – 8,5% (Kurniawan, 2024). Nilai ini mencerminkan kontrol glukosa darah yang optimal selama 2-3 bulan terakhir. Selain itu, kadar glukosa darah puasa (GDP) yang terkontrol berkisar antara 80–130 mg/dL, sedangkan glukosa darah 2 jam postprandial (GD2PP) idealnya di bawah 180 mg/dL (Soelistijo, S, 2021).

Tabel 1. Sasaran Pengendalian Diabetes Melitus (Sumber:PERKENI 2019)

Parameter	Sasaran
IMT (kg/m ²)	18,5 – 22,9
Tekanan darah sistolik (mmHg)	< 140 (B)
Tekanan darah diastolik (mmHg)	< 90 (B)
HbA1c (%)	< 7 atau individual (B)
Glukosa darah preprandial kapiler (mg/dL)	80 – 130
Glukosa darah 2 jam PP kapiler (mg/dL)	< 180
Kolesterol LDL (mg/dL)	< 100
	< 70 bila risiko KV sangat tinggi (B)
Trigliserida (mg/dL)	< 150 (C)
Kolesterol HDL (mg/dL)	Laki – laki : > 40; Perempuan > 50 (C)
Apo-B (mg/dL)	< 90

1.1.2. sCD40L dan Mekanisme Biologinya

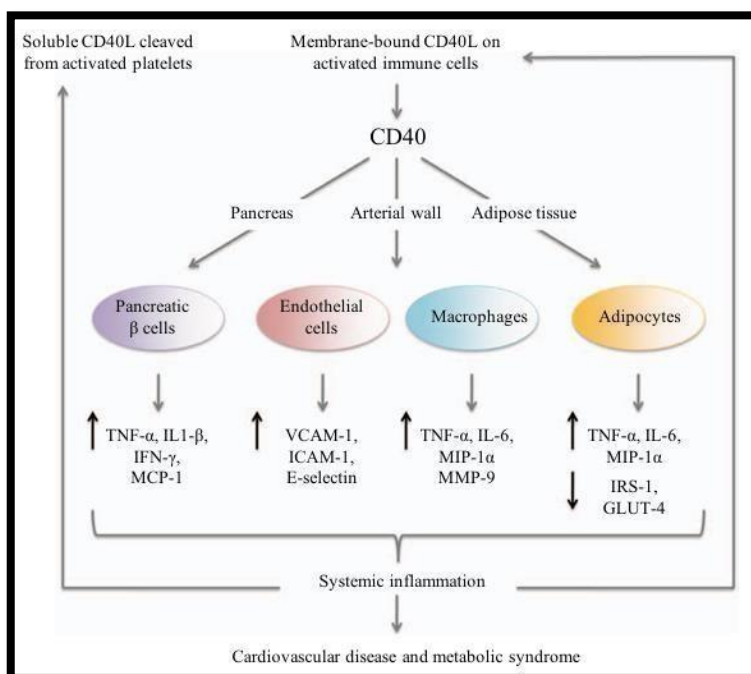
Struktur molekuler dan asal usul sCD40L menunjukkan bahwa molekul ini merupakan bentuk terlarut dari CD40 Ligand (CD40L). CD40 adalah protein transmembran tipe I yang termasuk dalam keluarga super tumor necrosis factor (TNF). Protein ini diekspresikan pada berbagai jenis sel, termasuk limfosit B, sel epitel, fibroblas, sel otot polos, dan trombosit. Ekspresi CD40 dapat diinduksi oleh berbagai stimulus proinflamasi seperti Interleukin (IL)-1, IL-3, IL-4, Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF- α), dan interferon- γ . CD40 memiliki struktur yang terdiri dari domain ekstraseluler, transmembran, dan sitoplasmik yang berfungsi untuk pengikatan ligan dan transduksi sinyal. Fungsi utamanya adalah mendukung respons imun dan proses inflamasi melalui interaksi dengan ligannya, CD40L (Kurniawan, 2016).

Soluble CD40L adalah bentuk terlarut dari CD40L yang dilepaskan oleh trombosit yang telah teraktivasi. Meskipun dilepaskan ke dalam sirkulasi, sCD40L tetap aktif secara biologis dan mampu berinteraksi dengan reseptor CD40 pada berbagai jenis sel target. Fungsi utama sCD40L adalah memediasi proses inflamasi, aktivasi trombosit, dan destabilisasi plak aterosklerotik melalui interaksi dengan molekul seperti OxLDL (Low-Density Lipoprotein teroksidasi). Selain itu, sCD40L juga berkontribusi terhadap disfungsi endotel dengan merangsang pelepasan *Reactive Oxygen Species* (ROS), meningkatkan ekspresi molekul adhesi seperti *Intercellular Adhesion Molecule* (ICAM) dan *Vascular Cell Adhesion Molecule* (VCAM), serta mengaktivasi matrix metalloproteinase (MMP) yang memperburuk kondisi inflamasi (Kurniawan, 2016).

Fungsi biologis sCD40L sebagai mediator inflamasi sangat penting dalam modulasi respons imun dan inflamasi, terutama melalui interaksinya dengan reseptor CD40 yang diekspresikan pada berbagai jenis sel, termasuk sel endotel, makrofag, sel dendritik, sel B, dan sel beta pankreas (Gambar 5). Ketika CD40 berinteraksi dengan CD40L yang terikat pada sel T atau trombosit, terjadi aktivasi sinyal yang memicu pelepasan sitokin proinflamasi, peningkatan ekspresi molekul adhesi seperti *Intercellular Adhesion Molecule-1* (ICAM-1) dan *Vascular Cell Adhesion Molecule-1* (VCAM-1), serta aktivasi enzim seperti MMPs (matrix metalloproteinases). Proses ini memperkuat respons imun dan inflamasi, yang penting dalam mekanisme pertahanan tubuh, tetapi juga dapat berkontribusi pada patologi seperti aterosklerosis jika aktivitasnya berlebihan. Selain itu, trombosit yang teraktivasi dapat melepaskan bentuk terlarut dari CD40L, yang dikenal sebagai sCD40L. Molekul ini tetap aktif secara biologis dan mampu berikatan dengan reseptor CD40 pada sel target lainnya, termasuk sel endotel dan makrofag. Interaksi ini merangsang produksi ROS, pelepasan molekul proinflamasi seperti COX-2 dan iNOS, serta aktivasi sel-sel imun lainnya. Dalam konteks patologi, sCD40L berkontribusi pada disfungsi endotel, aktivasi trombosit, dan destabilisasi plak

aterosklerotik (Kawabe et al., 2011).

Trombosit merupakan sumber utama sCD40L di sirkulasi darah dan memainkan peran kunci dalam inflamasi serta pembentukan trombus. Saat trombosit diaktifkan, mereka mengekspresikan CD40L di permukaannya dan melepaskan bentuk terlarutnya, sCD40L, yang kemudian berinteraksi dengan reseptor CD40 yang diekspresikan pada sel beta pankreas, sel endotel, adiposit, dan makrofag (Gambar 2). Interaksi ini memicu aktivasi jalur pensinyalan seperti NF- κ B dan MAPK, yang menginduksi ekspresi molekul adhesi seperti VCAM-1, ICAM-1, dan E-selectin. Molekul-molekul ini meningkatkan adhesi leukosit ke endotel vaskular dan memfasilitasi migrasi leukosit ke jaringan yang terinflamasi, memperkuat respon inflamasi (Seijkens et al., 2013).



Gambar 2. peran aktivasi CD40 oleh CD40L dalam berbagai jenis sel (Sumber: Seijkens et al., 2013)

1.1.3. sCD40L Pada Diabetes Melitus Tipe 2

Peningkatan kadar sCD40L pada DM2 merupakan hasil dari interaksi kompleks antara hiperglikemia, resistensi insulin, stres oksidatif, dan inflamasi kronis. Mekanisme ini melibatkan aktivasi trombosit, disfungsi endotel, dan gangguan metabolisme yang memperburuk inflamasi sistemik serta memicu pelepasan sCD40L ke dalam sirkulasi darah. Hiperglikemia kronis pada DM2

menyebabkan peningkatan stres oksidatif yang memicu aktivasi trombosit. Trombosit yang teraktivasi mengekspresikan CD40L di permukaannya dan melepaskan bentuk terlarutnya, yaitu sCD40L ke dalam plasma. Proses ini diperburuk oleh tingginya kadar glukosa dan asam lemak bebas yang meningkatkan aktivasi trombosit melalui jalur inflamasi dan disfungsi metabolik (Seijkens et al., 2013).

Peningkatan kadar sCD40L berkorelasi erat dengan resistensi insulin. Penelitian oleh Filozof et.al (2008) mengevaluasi hubungan antara kadar plasma sCD40L dengan sensitivitas insulin dan sekresi insulin pada pasien dislipidemia non-diabetes. Hasilnya menunjukkan bahwa pasien dengan resistensi insulin memiliki kadar sCD40L yang lebih tinggi dibandingkan dengan mereka yang memiliki sekresi insulin rendah. Hal ini dijelaskan karena sCD40L memperkuat jalur inflamasi yang menghambat sinyal insulin (Filozof et al., 2008).

Penelitian oleh Linna et.al (2016) menunjukkan bahwa kadar sCD40L meningkat seiring bertambahnya usia dan lebih tinggi pada individu dengan toleransi glukosa terganggu dibandingkan dengan mereka yang memiliki toleransi glukosa normal (Linna et al., 2016). Penelitian lain oleh Lim et.al (2004) Pasien dengan HbA1c >7% memiliki kadar sCD40L yang jauh lebih tinggi dibandingkan dengan pasien dengan HbA1c <7%, menunjukkan hubungan antara kontrol glikemik yang buruk dan peningkatan inflamasi sistemik. Kadar sCD40L yang tinggi ditemukan terkait dengan aktivasi trombosit dan peradangan yang berkontribusi pada komplikasi kardiovaskular pada pasien DMT2 (Lim et al., 2004).

Soluble CD40L memiliki potensi besar sebagai indikator kontrol glikemik pada pasien DMT2, terutama karena keterkaitannya yang erat dengan proses inflamasi kronis dan disfungsi metabolik. sCD40L dilepaskan terutama oleh trombosit yang teraktivasi, serta oleh limfosit T, makrofag, dan sel endotel, yang semuanya memainkan peran penting dalam respon imun dan inflamasi. Hiperglikemia kronis pada DMT2 memicu stres oksidatif dan inflamasi yang meningkatkan pelepasan sCD40L ke dalam sirkulasi darah, sehingga kadar sCD40L dapat mencerminkan derajat inflamasi dan kontrol glikemik pasien (Seijkens et al., 2013).

Studi oleh Cipollone et al. (2005) menunjukkan bahwa kadar sCD40L secara signifikan lebih tinggi pada pasien diabetes melitus tipe 1 dan tipe 2 dibandingkan dengan individu sehat. Analisis statistik mengungkapkan adanya korelasi positif yang kuat antara kadar HbA1c dan sCD40L ($p < 0.0001$). Korelasi ini menunjukkan bahwa kadar sCD40L meningkat seiring dengan peningkatan kadar HbA1c, yang mencerminkan kontrol glikemik yang buruk (Cipollone et al., 2005).

Artikel oleh Strohm et.al (2024) mengusulkan bahwa terapi yang menargetkan sCD40L memiliki potensi signifikan dalam mengendalikan inflamasi dan memperbaiki kontrol glikemik pada pasien DMT2. Jalur sinyal CD40–CD40L yang diaktifkan memicu kaskade inflamasi melalui faktor *transduksi TNF receptor*-

associated factor 6 (TRAF6) yang berkontribusi pada peningkatan stres oksidatif, disfungsi endotel, dan resistensi insulin. Penelitian eksperimental dalam artikel tersebut menunjukkan bahwa penghambatan TRAF6 dapat menurunkan ekspresi marker inflamasi dan stres oksidatif seperti TNF- α , IL-6, dan NADPH oksidase 2 (NOX2), serta meningkatkan fungsi endotel dan menurunkan tekanan darah pada model tikus diabetes dan hipertensi. Pada tikus diabetes yang diobati dengan inhibitor TRAF6, terdapat penurunan signifikan pada ekspresi protein CD40L, caspase-3, dan VCAM-1 yang mengindikasikan berkurangnya inflamasi dan apoptosis sel. Selain itu, terapi ini memperbaiki disfungsi endotel dan menormalkan pembentukan ROS (Strohm et al., 2024)

1.2 Perumusan Masalah

Berdasarkan uraian dalam latar belakang masalah di atas, dapat dirumuskan pertanyaan penelitian sebagai berikut: “Bagaimana hubungan kontrol glikemik dengan sCD40L serum pada penderita diabetes melitus tipe 2?”

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

Menganalisis hubungan kontrol glikemik dengan sCD40L serum pada subjek diabetes melitus tipe 2

1.3.2 Tujuan Khusus

- a. Diketuainya kadar sCD40L pada penderita Diabetes Melitus Tipe 2
- b. Diketuainya perbedaan kadar sCD40L berdasarkan kategori kontrol glikemik (HbA1c) pada penderita diabetes Melitus Tipe 2
- c. Diketuainya hubungan antara kadar sCD40L dengan kategori kontrol glikemik HbA1c.

1.4 Hipotesis Penelitian

- a. Terdapat perbedaan kadar sCD40L antara kategori kontrol glikemik pada penderita diabetes Melitus Tipe 2
- b. Peningkatan kadar sCD40L berbanding lurus dengan peningkatan persentasi HbA1c pada penderita Diabetes Melitus Tipe 2

1.5 Manfaat Penelitian

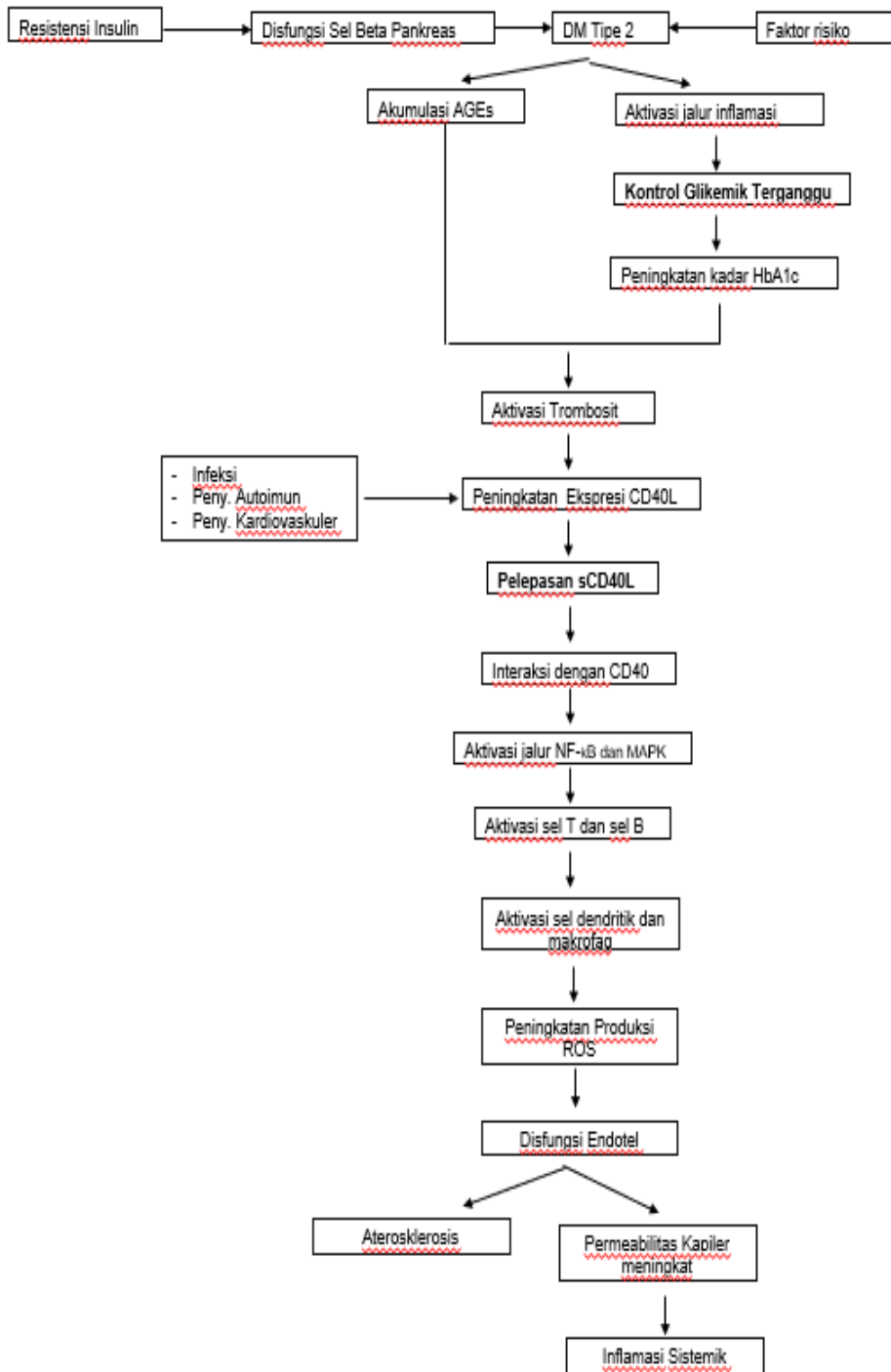
1.5.1 Manfaat Teoritis

- a. Menambah wawasan ilmiah mengenai peran sCD40L sebagai biomarker inflamasi dalam patogenesis diabetes melitus Tipe 2.
- b. Memperkaya literatur ilmiah tentang biomarker inflamasi yang berhubungan dengan kontrol glikemik.

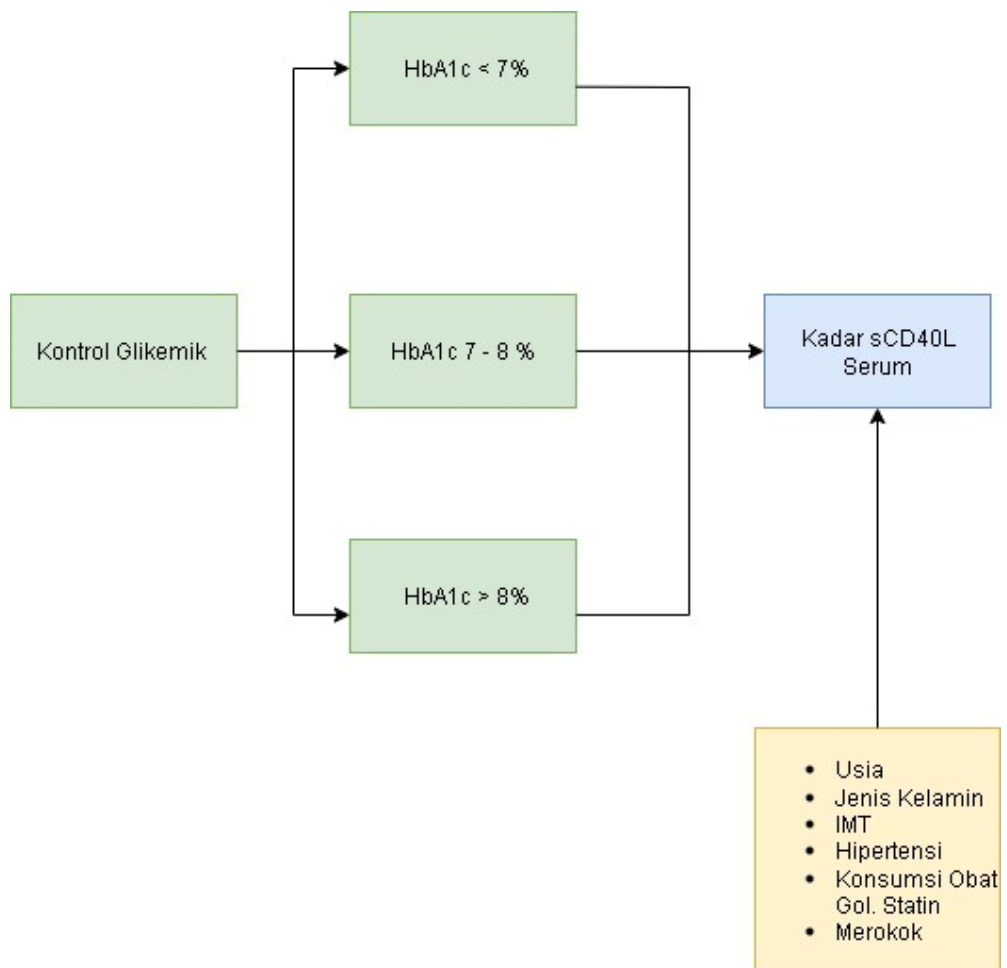
1.5.2 Manfaat Praktis

Mengembangkan biomarker yang lebih efektif pada penderita Diabetes Melitus Tipe 2.

1.6 Kerangka Teori



1.7 Kerangka Konsep



Keterangan



= Variabel Independen



= Variabel Perancu



= Variabel Dependen

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

- a. Poliklinik Endokrin dan Metabolik RS Wahidin Sudirohusodo dan RS Pendidikan Universitas Hasanuddin untuk pengambilan sampel
- b. Laboratorium Patologi Klinik RS Wahidin Sudirohusodo dan RS Pendidikan Universitas Hasanuddin untuk pengambilan sampel dan pemeriksaan sampel
- c. Unit Penelitian Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin/ Hasanuddin University Medical Research Center (HUMRC) untuk pemeriksaan spesimen

2.2.2 Waktu penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan April 2025 sampai Juni 2025

2.3 Populasi Penelitian

Semua penderita DM tipe 2 yang berobat di Poliklinik Endokrin dan Metabolik RS Wahidin Sudirohusodo dan RS Pendidikan Universitas Hasanuddin

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 RS Pendidikan Universitas Hasanuddin, 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.

2.5 Perkiraan Besar Sampel Penelitian

Perkiraan besar sampel dihitung berdasarkan rumus Lemeshow untuk lebih dari 2 kelompok:

$$n = \left[\frac{2 \left(Z_{1-\frac{\alpha}{2}} + Z_{1-\beta} \right)^2}{\delta^2} \right] \cdot \sigma^2$$

Keterangan:

n : jumlah sampel minimal per kelompok

σ : standar deviasi populasi (asumsi 10 ng/ml)

δ : Perbedaan rata-rata yang diharapkan terdeteksi (diperoleh : 9 ng/ml)

$Z_{1-\alpha/2}$: skor Z pada tingkat signifikansi 0.05 (dua sisi) = 1.96

$Z_{1-\beta}$: skor Z untuk kekuatan uji (power) 80% = 0.84

$$n = \frac{2 \times 10^2 \times (1.96 + 0.84)^2}{9^2} = \frac{1568}{81} \approx 19.35 \approx 20$$

Berdasarkan perhitungan dengan rumus di atas didapatkan jumlah minimal sampel pada penelitian ini adalah 20 sampel untuk masing-masing kelompok sehingga total sampel minimal adalah 60 sampel.

2.6 Kriteria Inklusi dan Eksklusi

2.6.1 Kriteria inklusi

- Pasien didiagnosis Diabetes melitus tipe 2 umur ≥ 18 tahun.
- Bersedia ikut dalam penelitian dengan menandatangani *informed consent*.

2.6.2 Kriteria eksklusi

- Penderita dengan riwayat penyakit jantung
- Penderita hamil
- Penderita dengan penyakit autoimun
- Penderita DM dengan penyakit keganasan
- Penderita dengan penyakit ginjal stadium akhir atau menjalani dialisis
- Spesimen hemolisis, ikterik dan tidak memungkinkan pengambilan sampel ulang

2.7 Izin Penelitian dan *Ethical Clearance*

Setiap tindakan dalam pelaksanaan penelitian ini dilakukan seizin dan sepengetahuan subjek yang dijadikan sampel penelitian melalui lembar *informed consent* dan dinyatakan memenuhi persyaratan etik untuk dilaksanakan dari Komite Etik Penelitian Kesehatan (KEPK) Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin-Rumah Sakit Pendidikan UNHAS-RS Wahidin Sudirohusodo Makassar dengan nomor *Ethical Clearance* : 190/UN4.6.4.5.31/PP36/2025.

2.8 Cara Kerja

2.8.1 Alokasi Subjek

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

2.8.2 Cara Penelitian

Penelitian ini dilakukan melalui beberapa tahapan sebagai berikut:

1. 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.
2. Subjek yang telah menandatangani lembar persetujuan kemudian dilakukan anamnesis, pemeriksaan fisik dan pengambilan darah vena sekitar 3-5 mL.
3. Sampel darah yang diambil dalam tabung tanpa antikoagulan, kemudian selama kurang lebih dua jam disentrifugasi selama 15 menit dengan kecepatan 1000 rpm, lalu supernatan yang berupa serum dikumpulkan dan dimasukan dalam cup sampel kurang lebih 150-200 μ L, kemudian disimpan pada suhu -20°C selama kurang lebih 1 bulan.

2.9 Prosedur Pemeriksaan sCD40L

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, yang disimpan pada suhu -20°C .

c. Alat dan bahan

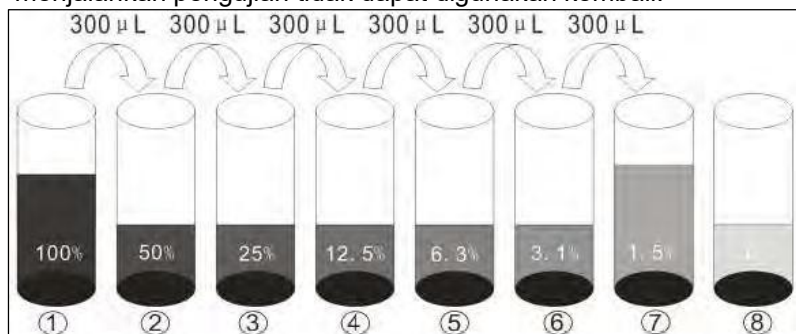
1. Alat: inkubator, *plate shaker*, *microplate reader* dengan filter 450 nm, mikropipet, *assay plate*, tip pipet mikro, *tube disposable*, kertas *absorbent*, *Microelisa stripplate*.
2. Bahan: serum, air suling, larutan standar, reagen sCD40L (*MyBiosource*, USA, 2021b)

d. Persiapan Reagen dan Standar

1. Dikeluarkan kit ELISA dari lemari es 20 menit sebelum digunakan.
2. Diencerkan *wash buffer* pekat dengan air suling (1:25).
3. Ditambahkan 1,0 mL pengencer standar ke dalam botol standar terliofiliasi

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: 20, 10, 5, 2,5, 1,25, 0,625, 0,312 ng/mL. Catatan: pastikan standar terliofilisasi benar-benar larut dan tercampur dengan baik

4. Metode pengenceran sampel standar: diambil 7 tabung bersih dan beri label dengan konsentrasi yang diharapkan (10,5, 2,5, 1,25, 0,625, 0,312 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. Selanjutnya pipet 300 μ L pengencer standar ke dalam setiap tabung dan tambahkan ke dalam tabung 10 ng/L, dan tambahkan ke 5 ng/mL dan aduk rata. Ulangi Langkah Langkah ini melalui standar 0,312 ng/mL. Pengencer standar dalam tabung 0 ng/L adalah control negative. Catatan: larutan standar yang dilarutkan 20 ng/mL harus dibuang setelah menjalankan pengujian tidak dapat digunakan kembali.



Gambar 3 Pengenceran Standar Reagen sCD40L

Sumber: MyBioSource, USA, 2021b

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.

6. Reagen warna: disiapkan 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 sCD40L. Antibodi yang dilapisi sebelumnya adalah antibodi monoklonal anti-Human sCD40L,

sedangkan antibodi deteksi adalah antibodi poliklonal terbiotinilasi. Sampel dan antibodi terbiotinilasi ditambahkan ke dalam sumur pelat ELISA dan dicuci dengan PBS atau TBS setelah masing-masing ditambahkan ke dalam sumur. Kemudian konjugat Avidin-peroksidase ditambahkan ke dalam sumur setelahnya. Substrat TMB digunakan untuk pewarnaan setelah konjugat enzim telah dicuci secara menyeluruh dari sumur dengan PBS atau TBS. TMB bereaksi membentuk produk biru dari aktivitas peroksidase, dan akhirnya berubah menjadi kuning setelah penambahan larutan penghenti (Reagen Warna C)

b. Cara kerja

1. Dikeluarkan strip sesuai jumlah yang dibutuhkan, dan dibiarkan pada suhu ruangan.
2. Ditambahkan 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.
3. Disiapkan sejumlah *Biotinylated Antibody* yang diperlukan 30 menit sebelumnya.
4. dicuci pelat ELISA 2 kali.
5. Ditambahkan 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.
6. Disiapkan sejumlah enzim konjugat yang diperlukan 30 menit sebelumnya.
7. Pelat ELISA dicuci 3 kali.
8. Ditambahkan 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.
9. Pelat ELISA dicuci 5 kali.
10. Ditambahkan 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.
11. Ditambahkan 100 μ L reagen warna C ke masing-masing sumur (juga ke dalam sumur kosong) kemudian diaduk rata dan baca *Optical Density* (OD) pada 450nm dalam waktu 10 menit.

3. Pasca analitik

1. Kurve standar ditentukan berdasarkan perhitungan nilai OD sesuai konsentrasi standar. Rentang deteksi 20 ng/mL -0.06 ng/mL.

2.10 Definisi Operasional dan Kriteria Objektif

1. Penderita diabetes melitus tipe 2 adalah semua penderita yang didiagnosis diabetes melitus tipe 2 oleh klinisi di Poliklinik Endokrin dan Metabolik RS Wahidin Sudirohusodo, RS Pendidikan Universitas Hasanuddin dan diketahui melalui rekam medis subjek yang memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi penelitian.
2. *Soluble* CD40L (sCD40L) adalah proinflamasi yang dilepaskan oleh trombosit teraktivasi dan limfosit yang menunjukkan tingkat inflamasi. Kadar sCD40L diperiksa pada sampel serum subjek DM tipe 2 dengan metode *ELISA* menggunakan *Human Soluble CD40L ELISA Kit* (MyBioSource, USA). Rentang deteksi 20 ng/mL -0.06 ng/mL
3. Kontrol Glikemik adalah parameter untuk menilai kadar glukosa darah dan efektivitas pengelolaan diabetes melitus dengan persentasi HbA1c dari hasil pemeriksaan laboratorium dan tercantum dalam rekam medis. Berdasarkan level HbA1c dibagi dalam 3 kelompok
 - Kontrol glikemik HbA1c < 7 %
 - Kontrol glikemik HbA1c 7 - 8 %
 - Kontrol glikemik HbA1c > 8%
4. HbA1c adalah parameter biokimia yang mengukur persentase hemoglobin yang terglukasi sebagai indikator rata-rata kadar glukosa darah selama 2-3 bulan terakhir, digunakan sebagai standar untuk menilai kontrol glikemik pasien, data data diambil dari rekam medis pada waktu terdekat dengan pengambilan sampel sCD40L.

2.11 Analisis Data

Seluruh data yang diperoleh dikelompokkan sesuai tujuan dan jenis data, kemudian dianalisis dengan metode statistik yang sesuai:

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 untuk mengetahui hubungan antara dua variabel. Hasil uji hipotesis disajikan dalam bentuk tabel, diagram dan narasi. Hasil uji hipotesis dinyatakan bermakna jika $p < 0,05$

2.12 Alur Penelitian

