

**KORELASI TGF- $\beta$ 1 PRODUK MONOSIT DARAH TEPI  
DENGAN KEBOCORAN VASKULER PADA DEMAM  
BERDARAH DENGUE**

*(Correlation between Monocyte Transforming Growth Factor – Beta 1,  
and Vascular Leakage in Dengue Hemorrhagic Fever)*



**TESIS**

**Untuk memenuhi sebagian persyaratan mencapai derajat S-2 dan  
memperoleh keahlian dalam bidang Ilmu Kesehatan Anak**

**Haryson Tondy Winoto**

**G4A004039**

**PROGRAM PASCASARJANA  
MAGISTER ILMU BIOMEDIK  
DAN  
PROGRAM PENDIDIKAN DOKTER SPESIALIS I  
ILMU KESEHATAN ANAK  
FAKULTAS KEDOKTERAN  
UNIVERSITAS DIPONEGORO SEMARANG  
2009**

# LEMBAR PENGESAHAN

## TESIS

### KORELASI TGF- $\beta$ 1 PRODUK MONOSIT DARAH TEPI DENGAN KEBOCORAN VASKULER PADA DEMAM BERDARAH DENGUE

disusun oleh:

**Haryson Tondy Winoto**  
**G3C005020 / G4A004039**

Telah dipertahankan di depan Tim Penguji  
pada tanggal 8 Desember 2009  
dan dinyatakan telah memenuhi syarat untuk diterima

**Menyetujui,**  
**Komisi Pembimbing**

Pembimbing Utama

Pembimbing Kedua

DR.dr. Tatty Ermin Setiati, SpA(K), Ph.D  
NIP. 14001237

dr. Kisdjamiatun RMD., MSc  
NIP. 131916041

Mengetahui,  
Ketua Program Studi PPDS IKA  
Fakultas Kedokteran Universitas  
Diponegoro

Mengetahui,  
Ketua Program Studi Magister Ilmu Biomedik  
Program Pascasarjana Universitas Diponegoro

dr. Alifiani Hikmah P, SpA(K)  
NIP. 140214483

Dr.dr. Winarto, SpMK(K), SpM  
NIP. 130675157

## **PERNYATAAN**

Dengan ini saya menyatakan bahwa :

- Tesis ini adalah hasil pekerjaan saya sendiri dan didalamnya tidak terdapat karya yang pernah diajukan untuk memperoleh gelar kesarjanaan di suatu perguruan tinggi dan lembaga pendidikan lainnya. Pengetahuan yang diperoleh dari hasil penerbitan maupun yang belum/tidak diterbitkan, sumbernya dijelaskan di dalam tulisan dan daftar pustaka.
- Hasil penelitian ini selanjutnya menjadi milik Bagian Ilmu Kesehatan Anak Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro / RSUP. Dr. Kariadi Semarang dan karenanya untuk kepentingan publikasi keluar harus seizin Ketua Bagian tersebut di atas

Semarang, Desember 2009

**Haryson Tondy Winoto**

## **RIWAYAT HIDUP**

### **Data Pribadi**

- Nama : Haryson Tondy Winoto
- Jenis Kelamin : Laki-laki
- Tempat dan Tanggal Lahir : Surabaya, 3 Pebruari 1972
- Agama : Kristen
- Status : Menikah
- Alamat : Jl. Darmo Indah Selatan KK-30 Surabaya

### **Riwayat Pendidikan**

- SD Siwi Bhakti Surabaya : Lulus Tahun 1984
- SMP Negeri 5 Surabaya : Lulus tahun 1987
- SMA Negeri 2 Surabaya : Lulus tahun 1990
- FK UNIBRAW Malang : Lulus tahun 1998
- PPDS-I Ilmu Kesehatan Anak Fakultas UNDIP : Januari 2005 - sekarang
- Magister Ilmu Biomedik UNDIP : Januari 2005 - sekarang

### **Riwayat Pekerjaan**

- 2000-2001 Dokter UGD RS Panti Waluyo Malang, Jawa Timur
- 2000-2001 Dokter UGD RS Bala Keselamatan Turen, Malang ,Jawa Timur
- Maret 2001 – Maret 2004, Dokter PTT di Puskesmas Batu Marmar, Kabupaten Pamekasan, Madura - Jawa Timur.

### **Riwayat Keluarga**

- Nama Orang Tua :  
Ayah : Soewito, BA  
Ibu : Agustine Marie Lahenda
- Nama Istri : dr. Meida Handayani Telaumbanua, MKes

## KATA PENGANTAR

Puji syukur saya panjatkan ke hadirat Allah Yang Maha Pemurah, karena berkat karunia-Nya, Laporan Penelitian yang berjudul “**Korelasi TGF- $\beta$ 1 Produk Monosit Darah Tepi Dengan Kebocoran Vaskuler Pada Demam Berdarah Dengue**“ dapat saya selesaikan, guna memenuhi sebagian persyaratan dalam mencapai derajat S-2 dan memperoleh keahlian dalam bidang Ilmu Kesehatan Anak (IKA) Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro (FK UNDIP).

Saya menyadari bahwa tulisan ini masih jauh dari sempurna karena keterbatasan yang saya miliki. Namun karena dorongan keluarga, bimbingan guru-guru kami dan teman-teman maka tulisan ini dapat terwujud.

Banyak sekali pihak yang telah berkenan membantu saya dalam menyelesaikan penulisan ini, jadi kiranya tidaklah berlebihan apabila pada kesempatan ini saya menghaturkan rasa terima kasih dan penghormatan yang setinggi-tingginya kepada:

1. Rektor Universitas Diponegoro Semarang, **Prof. DR. Dr. Susilo Wibowo, MS. Med, Sp.And** dan mantan Rektor **Prof. Ir. Eko Budiardjo, M.Sc** dan beserta jajarannya yang telah memberikan ijin bagi saya untuk menempuh PPDS-1 IKA FK UNDIP Semarang.
2. Direktur Program Pasca Sarjana Universitas Diponegoro, **Prof. Drs. Y. Warella, MPA, Ph.D** yang telah memberikan ijin kepada saya untuk menempuh Program Pasca Sarjana UNDIP Semarang.
3. Ketua Program Studi Magister Ilmu Biomedik Program Pascasarjana UNDIP Semarang **DR. dr. Winarto, Sp.MK, Sp.M** dan para pengelola, **DR. dr. Andrew Johan MsiMed, dr. Neni Susilaningsih MsiMed** yang telah meluangkan waktu, tenaga dan pikiran untuk memberi pengarahan dan dukungan moril selama pendidikan.

4. Dekan FK UNDIP **dr. Soejoto, PAK, Sp.KK(K)** beserta jajarannya yang telah memberikan kesempatan kepada saya untuk mengikuti PPDS-1 IKA FK UNDIP.
5. Direktur Utama Rumah Sakit Dr. Kariadi Semarang **dr. Budi Riyanto, Sp.PD, M.Sc**, beserta jajaran Direksi yang telah memberikan ijin kepada saya untuk menempuh PPDS-1 IKA di Bagian IKA / SMF Kesehatan Anak di RSUP Dr. Kariadi Semarang.
6. Ketua Bagian Ilmu Kesehatan Anak FK UNDIP / SMF Kesehatan Anak RSUP Dr. Kariadi Semarang, **dr. Dwi Wastoro SpA(K)** dan **dr. Budi Santosa, Sp.A(K)** selaku mantan Ketua Bagian Ilmu Kesehatan Anak RSUP Dr. Kariadi Semarang yang telah memberikan kesempatan kepada saya untuk mengikuti PPDS-1.
7. **DR. dr. Tatty Ermin Setiati, Sp.A(K), Ph.D** sebagai Pembimbing Utama dalam penelitian ini, secara khusus saya sampaikan ucapan terima kasih dan penghargaan yang setinggi-tingginya atas segala ketulusan dalam memberikan bimbingan, wawasan, arahan dan meluangkan waktu sehingga saya dapat penyelesaian penelitian ini.
8. Saya sampaikan juga ucapan terima kasih kepada **dr. Kisdjmitun RMD, MSc** sebagai Pembimbing Kedua dalam penelitian ini atas segala ketulusannya, dalam memberikan bimbingan, motivasi, wawasan, arahan sehingga saya dapat menyelesaikan penelitian ini.
9. **dr. MM DEAH Hapsari Sp.AK**, selaku dosen wali pembimbing selama menjalani pendidikan di PPDS-1 IKA FK UNDIP, atas bimbingannya kepada saya.
10. Ketua Program Studi PPDS-1 IKA FK UNDIP, **dr. Alifiani Hikmah P, Sp.A(K)** dan Direktur Keuangan Rumah Sakit Dr. Kariadi Semarang / mantan Ketua Program Studi PPDS-1 IKA FK UNDIP, **dr. Hendriani Selina, Sp.A(K), MARS** saya sampaikan ucapan terima kasih dan penghargaan

setinggi-tingginya atas pengertian dalam memberikan arahan, dorongan dan motivasi terus-menerus dalam menyelesaikan penelitian ini.

11. **Prof. DR. Dr. Tjahyono, Sp.PA(K), FIAC, Prof. Dr. Lisyani Suromo Sp.PK(K), DR. dr. Tatty Ermin Setiati, Sp.A(K), PhD, dr. Budi Santosa, Sp.A(K) dr. Niken Puruhita Sp.GK,** saya ucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya atas kesediaannya sebagai tim penguji Proposal serta segala bimbingannya untuk perbaikan dan penyelesaian Tesis ini.
12. Para guru besar dan guru-guru saya, staf pengajar di Bagian IKA Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro / RS. Dr. Kariadi Semarang : Prof. dr. Moeljono S. Trastotenojo, Sp.A(K), Prof. DR. dr. Ag. Soemantri, Sp.A(K), Ssi (Stat), Prof. DR. dr. I. Sudigbia, Sp.A(K), Prof. DR. dr. Lydia Kristanti K, Sp.A(K), Prof. DR. dr. Harsoyo N, Sp.A(K), DTM&H, Prof. dr. M. Sidhartani Zain, MSc, SpA(K), dr. R. Rochmanadji Widajat, Sp.A(K), MARS, dr. Moedrik Tamam, Sp.A(K), dr. H.M. Sholeh Kosim, Sp.A(K), dr. Rudy Susanto, Sp.A(K), dr. I. Hartantyo, Sp.A(K), dr. Herawati Juslam, Sp.A(K), dr. JC Susanto, Sp.A(K), dr. Agus Priyatno, Sp.A(K), dr. Asri Purwanti, Sp.A(K), MPd, dr. Bambang Sudarmanto, Sp.A(K), dr. MMDEAH Hapsari, Sp.A(K), dr. Mexitalia Setiawati, Sp.A(K), dr. M. Herumuryawan, Sp.A, dr. Gatot Irawan Sarosa, Sp.A, dr. Anindita S, Sp.A, dr. Wistiani, Sp.A, dr. M. Supriatna, SpA, dr. Fitri Hartanto Sp.A, dr. Omega Mellyana, SpA, dr. Ninung Rose Diana, SpA, dr. Yetty Moevita, SpA, dr. Nahwa Arkhaesi, SpA yang telah berperan besar dalam proses pendidikan saya.
13. **dr. Hardian, MSc** yang telah dengan tulus hati membantu saya dalam pengolahan data, membimbing dan memberi arahan dalam pembuatan proposal dan penyusunan laporan penelitian ini.
14. Seluruh teman sejawat peserta PPDS-I, khususnya kepada anggota Tim DHF 2005-2006, dr. Abdul Hakam, dr. Zuhrawardi, Sp.A ,dr. Yusrina Istanti, Sp.A dr. Ni Putu Aniek M, dr. Liku S, Sp.A dan dr. Novita W, Sp.A

15. Rekan-rekan dari Lab. Bioteknologi Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro, Sdr. Taufik dan Sdri. Wiwik Lestari dan dari Lab. Patologi Klinik RSUP Dr. Kariadi Semarang, Sdr. Agus Kismono dan Sdr. Supriyanto, serta rekan-rekan perawat RSUP Dr. Kariadi Semarang atas kerjasama dan bantuannya selama ini.
16. Orang tuaku tercinta dan Kakak-kakakku tersayang atas bantuan, perhatian, dukungan, nasehat dan doa tulus sejak saya memulai pendidikan hingga sekarang.
17. Mertuaku tercinta yang dengan penuh kasih sayang dan perhatian memberikan perhatian dan dorongan semangat dalam menempuh pendidikan hingga sekarang
18. Istri terkasih **dr. Meida Handayani M.Kes**, terima kasih karena senantiasa menjadi sumber kebahagiaan dan kekuatan tak terkira pada saya.
19. Kepada semua pasien dan keluarganya yang telah turut berpartisipasi secara ikhlas baik dalam penelitian ini maupun kepada mereka yang selama ini telah banyak memberi pelajaran yang sangat saya butuhkan untuk dapat menjadi seorang dokter yang baik, saya sampaikan terima kasih serta penghargaan setinggi-tingginya

Akhirnya dari lubuk hati yang paling dalam, penulis juga menyampaikan permintaan maaf kepada semua pihak yang mungkin telah mengalami hal yang kurang berkenan dalam berinteraksi dengan penulis selama kegiatan penelitian ini. Semoga Allah Maha Kasih senantiasa melimpahkan berkat dan karunia-NYA kepada kita sekalian, Amin.

Semarang, Desember 2009

**Haryson Tondy Winoto**

## DAFTAR ISI

	Halaman
Halaman Judul .....	i
Lembaran Pengesahan .....	ii
Pernyataan .....	iii
Riwayat Hidup .....	iv
Kata Pengantar .....	vi
Daftar Isi .....	xi
Daftar Gambar .....	xiii
Daftar Tabel .....	xiii
Daftar Lampiran .....	xiv
Abstrak .....	xv
Bab 1. Pendahuluan .....	1
1.1. Latar Belakang .....	1
1.2. Perumusan Masalah .....	3
1.3 Tujuan Penelitian.....	3
1.4. Manfaat Penelitian .....	4
1.5. Orisinalitas Penelitian.....	4
Bab 2. Tinjauan Pustaka .....	7
2.1. Demam Berdarah Dengue .....	7
2.2. Imunopatogenesis Demam Berdarah Dengue.....	9
2.3. Hubungan TGF $\beta$ 1 dan Kebocoran vaskuler pada DBD.....	12
2.4. Peran LPS dan Monosit pada infeksi Dengue.....	11
2.5. Hubungan Status Gizi dan DBD.....	16
2.6. Hubungan Sepsis dan DBD .....	17
2.7. DBD dan Manifestasi perdarahan.....	18
2.8. Kerangka Teori.....	20
2.9. Kerangka Konsep.....	21
2.10. Hipotesis.....	21

Bab 3. Metode Penelitian .....	22
3.1. Ruang lingkup penelitian .....	22
3.2. Tempat dan waktu penelitian .....	22
3.3. Jenis dan rancangan penelitian .....	22
3.4. Populasi dan sampel .....	22
3.4.1. populasi target .....	22
3.4.2. populasi terjangkau .....	22
3.4.3. sampel penelitian .....	22
3.4.3.1. Kriteria Inklusi .....	23
3.4.3.2. Kriteria Eksklusi .....	23
3.4.4. cara sampling .....	23
3.4.5. besar sampel .....	23
3.5. Variabel penelitian .....	24
3.6. Definisi operasional .....	24
3.7. Cara dan Pengumpulan data.....	25
3.8. Alur penelitian .....	27
3.9. Analisis data .....	28
3.10. Etika penelitian .....	28
Bab 4. Hasil Penelitian .....	32
4.1. Karakteristik sampel .....	30
4.2. Produksi TGF $\beta$ 1 monosit.....	30
4.3. Pengukuran Parameter Kebocoran vaskuler.....	32
4.4. Korelasi kadar TGF- $\beta$ 1 monositdengan parameter kebocoran vaskuler.....	32
Bab5. Pembahasan .....	36
Bab 6. Simpulan dan saran .....	39
Daftar Pustaka .....	40
Lampiran-lampiran .....	45

## DAFTAR GAMBAR

		Halaman
Gambar 1	Kaskade sitokin pada DBD.....	13
Gambar 2	Mekanisme stimulasi LPS pada Monosit/makrofag .....	16
Gambar 3	Interaksi LPS dengan aktivasi endotel pada sepsis .....	18
Gambar 4	Cara penghitungan efusi pleura.....	26
Gambar 5	Kadar TGF- $\beta$ 1 monosit pada pemeriksaan hari ke-0 dan ke-2	31
Gambar 6	Korelasi antara TGF-monosit dengan IEP pada hari ke-0 perawatan.	35
Gambar 7	Korelasi antara TGF-monosit dengan IEP pada hari ke-2 perawatan.	36

## DAFTAR TABEL

		halaman
Tabel 1	Karakteristik penderita DBD .....	30
Tabel 2	Hasil pengukuran parameter kebocoran vaskuler .....	32
Tabel 3	Korelasi TGF- $\beta$ 1 monosit dengan IEP, hematokrit, protein total, albumin pada pemeriksaan hari ke-0 .....	33
Tabel 4	Korelasi TGF- $\beta$ 1 monosit dengan IEP, hematokrit, protein total, albumin pada pemeriksaan hari ke-2.....	33

## DAFTAR LAMPIRAN

- |            |  |
|------------|--|
| Lampiran 1 | Sampel penelitian  |
| Lampiran 2 | <i>Ethical Clearance</i> (penelitian payung)                       |
| Lampiran 3 | Lembar <i>Informed Consent</i> penelitian dan status penderita DBD |
| Lampiran 4 | Hasil-hasil pengolahan data dengan SPSS 15.0                       |

## DAFTAR SINGKATAN

DBD	: demam berdarah dengue
DD	: demam dengue
SSD	: sindroma syok dengue
TGF- $\beta$ 1	: <i>transforming growth factor beta 1</i>
TNF $\alpha$	: <i>tumor necrosis factor alfa</i>
ICAM	: <i>intercellular adhesion molecule</i>
VCAM	: <i>vasculer cell adhesion molecule</i>
RANTES	: <i>regulated and activation T cell excretion and secretion</i>
IFN	: <i>interferon</i>
IL	: <i>interleukin</i>
NK	: <i>natural killer</i>
RLD	: <i>right lateral decubitus</i>
NO	: <i>nitrit oxide</i>
DOM	: disfungsi organ multipel
IEP	: Indeks efusi pleura
PEI	: <i>Pleural Effusion Index</i>

## ABSTRACT

**Background.** The generally accepted view that blood monocytes are the principal target of virus infection suggests that virus-infected monocytes may produce a vasoactive factor which might affect endothelial cell function, possibly contributing to vascular leakage. Transforming growth factor beta 1 (TGF- $\beta$ 1) is one of cytokines that plays a variety of roles in pathogenesis of dengue hemorrhagic fever (DHF).

**Aims.** To determine the correlation among TGF- $\beta$ 1 to PEI, total protein, albumin and hematocrit as vascular leakage markers on DHF.

**Methods.** This was an observational study with cross sectional design. Subjects were DHF patients that hospitalized in Dr. Kariadi Hospital during July, 2005 – July 2006, 3-14 years old. TGF- $\beta$ 1 product of monocyte, PEI, total protein and albumin levels, and hematocrit were measured on day 0 and 2. The correlation between TGF- $\beta$ 1 levels and PEI, total protein and albumin levels, and hematocrit on day 0 and 2 were analyzed

**Results.** Subjects were mostly females, means of age  $7,1 \pm 2,43$  years. Means of TGF- $\beta$ 1 product of monocyte levels on day-2 ( $43.29 \pm 28.012$  pg/ml) were higher than day-0 ( $35.27 \pm 34.642$  pg/ml);  $p=0,09$  (Wilcoxon test). Correlation test among TGF- $\beta$ 1 monocyte level, IEP, protein total, albumin, hematocrit on day-0 ( $r = -0,31$   $p=0,04$  ;  $r= 0,19$   $p=0,2$  ;  $r=0,11$   $p=0,5$ ;  $r=- 0,08$   $p=0,6$  ); on day-2 ( $r = -0,2$   $p=0,3$ ;  $r= 0,2$   $p=0,2$ ;  $r=0,2$   $p=0,2$ ;  $r=-0,04$   $p=0,8$ )

**Conclusions.** There is correlation between TGF- $\beta$ 1 monocyte product level and PEI on day-0. There is no correlation between TGF- $\beta$ 1 monocyte product level and PEI on day-2, neither, Total protein, albumin and hematocrit on day-0 and on day-2.

**Keywords :** TGF- $\beta$ 1, PEI, protein total, albumin, hematocrit, DHF

## ABSTRAK

**Latar Belakang.** Monosit merupakan target utama infeksi virus dengue yang mengakibatkan sekresi vasoaktif yang mempengaruhi endotel dan mengakibatkan kebocoran vaskuler. *Transforming growth factor* beta 1 (TGF- $\beta$ 1) merupakan salah satu sitokin yang memiliki berbagai peran dalam patogenesis demam berdarah dengue (DBD).

**Tujuan.** Untuk mengetahui korelasi antara kadar TGF- $\beta$ 1 produk monosit terhadap IEP, protein total, albumin dan hematokrit sebagai petanda kebocoran vaskuler.

**Metoda.** Penelitian observasional analitik dengan desain belah lintang. Subjek adalah pasien DBD yang dirawat di bangsal anak RSUP. Dr. Kariadi selama bulan Juli 2005 – Juli 2006, berumur 3-14 tahun. Dilakukan uji korelasi untuk mengetahui hubungan kadar TGF- $\beta$ 1 monosit dengan IEP, protein total, albumin dan hematokrit pada hari ke 0 dan ke-2

**Hasil.** Sebagian besar subjek adalah perempuan, rerata umur  $7,1 \pm 2,43$  tahun. Rerata kadar TGF- $\beta$ 1 hari ke-2 ( $43.29 \pm 28.012$  pg/ml) lebih tinggi daripada hari ke-0 ( $35.27 \pm 34.642$  pg/ml);  $p=0,09$  (uji Wilcoxon). Uji korelasi kadar TGF- $\beta$ 1 monosit dengan IEP, protein total, albumin, hematokrit hari ke-0  $r = -0,31$   $p=0,04$ ;  $r = 0,19$   $p=0,2$ ;  $r=0,11$   $p=0,5$ ;  $r=-0,08$   $p=0,6$ , hari ke-2  $r = -0,2$   $p=0,3$ ;  $r = 0,2$   $p=0,2$ ;  $r=0,2$   $p=0,2$ ;  $r=-0,04$   $p=0,8$ .

**Simpulan.** Terdapat korelasi negatif bermakna kadar TGF- $\beta$ 1 produk monosit darah tepi dengan IEP pada hari pengamatan ke-0, tidak terdapat korelasi bermakna pada pengamatan hari ke-2. Tidak terdapat korelasi bermakna antara kadar TGF- $\beta$ 1 produk monosit darah tepi dengan protein total, albumin dan hematokrit pada hari pengamatan ke-0 dan hari pengamatan ke-2

**Kata kunci :** TGF- $\beta$ 1, IEP, protein total, hematokrit, albumin, demam berdarah dengue

## BAB 1

### PENDAHULUAN

#### 1.1 Latar Belakang

Demam berdarah dengue (DBD) dan sindroma syok dengue (SSD) adalah salah satu penyebab utama perawatan di rumah sakit pada pasien anak. Infeksi virus Dengue dapat menimbulkan penyakit yang serius yaitu SSD. Angka kematian DBD berat akibat syok berkepanjangan, syok berulang dan perdarahan masif yang dirawat di *Pediatric Intensive Care Unit* ( PICU ) RSUP Dr. Kariadi masih tinggi, 51,2 % pada tahun 1998 dan 12 % pada tahun 2002. Deteksi dini syok, peningkatan kualitas pemantauan, dan perubahan pengelolaan terapi cairan, menurunkan angka kematian SSD menjadi 10,8% pada tahun 2004.<sup>1</sup>

Pada awal hingga pertengahan tahun 2004, terjadi kejadian luar biasa (KLB) demam berdarah di Indonesia. Jumlah kasus DBD di Indonesia sejak Januari sampai dengan Mei 2004 mencapai 64.000 orang (*incidence rate* 29,7 per 100.000 penduduk) dengan kematian sebanyak 724 orang (*case fatality rate* 1,1%). Faktor-faktor yang mempengaruhi peningkatan dan penyebaran kasus DBD melibatkan beberapa aspek yaitu : (1) pertumbuhan penduduk yang tinggi, (2) urbanisasi yang tidak terencana & tidak terkendali, (3) tidak adanya kontrol vektor yang efektif di daerah endemis dan (4) peningkatan sarana transportasi.

Penelitian sebelumnya membuktikan bahwa faktor hemostasis dan faktor kebocoran vaskuler merupakan faktor diskriminan untuk memprediksi syok pada

DBD.<sup>1</sup> Kebocoran vaskuler dengan berbagai derajat manifestasi klinis merupakan akibat respons kekebalan, yang melibatkan beberapa sitokin antiinflamasi dan proinflamasi. *Transforming growth factor beta 1* (TGF- $\beta$ 1) adalah salah satu sitokin yang diduga mempunyai peran pada patogenesis DBD.<sup>2-6</sup> Patofisiologi utama pada DBD adalah peningkatan permeabilitas kapiler dan gangguan hemostasis. Kenaikan difus permeabilitas vaskuler menyebabkan kebocoran plasma.<sup>7,8</sup> Kebocoran plasma dibuktikan dengan adanya hemokonsentrasi yang ditandai oleh peningkatan hematokrit, hipoproteinemia, hipoalbuminemia dan efusi pleura.<sup>1</sup>

Penelitian yang pernah dilakukan terhadap 79 anak, saat terjadi epidemi DBD di India utara menunjukkan adanya keterkaitan kadar TGF-  $\beta$ 1 terhadap beratnya manifestasi DBD.<sup>2</sup> Kadar TGF- $\beta$ 1 plasma mulai terdeteksi pada awal perjalanan penyakit yaitu pada hari ke 1-4 demam, dan secara bertahap meningkat pada hari ke 4-8 sakit. Didapatkan kadar TGF- $\beta$ 1 plasma paling tinggi pada DBD derajat IV.<sup>2,3</sup> TGF- $\beta$ 1 dihasilkan oleh monosit, sel *natural killer* (NK), *lymphokine-activated killer cells*, sel B dan sel CD4<sup>+</sup> maupun sel CD8<sup>+</sup>.<sup>2</sup> Monosit merupakan target utama infeksi virus dengue.<sup>9-12</sup> Virus dengue yang menginfeksi monosit akan bereplikasi dan menyebabkan pelepasan sitokin. TGF- $\beta$ 1 merupakan salah satu sitokin yang disekresikan oleh monosit pada saat berlangsungnya infeksi dengue. TGF  $\beta$ 1 menghambat sel Th1 sehingga terjadi pergeseran respon imun dari sel Th1 menjadi respon imun sel Th2 dimana sel Th2 ini akan mensekresi sitokin IL-4, IL5, IL-6, IL 10 dan IL-13 yang menginduksi kebocoran vaskuler.

Peran IL-12 yang dihasilkan sel Th1 selama infeksi virus dengue dihambat oleh TGF- $\beta$ 1, mengakibatkan dominasi peran sel Th2. Pergeseran dari respon Th1

predominan ke Th2 mengakibatkan perubahan manifestasi infeksi dengue, dari demam dengue ke DBD stadium IV yang berat. <sup>4</sup>

Pemeriksaan kadar TGF- $\beta$ 1 produk monosit darah tepi dan parameter kebocoran vaskuler akan dilakukan pada hari pengamatan ke-0 ( hari pertama saat penderita DBD dirawat atau hari saat diagnosis DBD pertama kali ditegakkan berdasarkan kriteria WHO tahun 1999, sesuai demam hari ke-4 ) dan hari pengamatan ke-2 ( hari ketiga perawatan terhitung sejak penderita DBD dirawat atau sejak diagnosis DBD pertama kali ditegakkan, sesuai demam hari ke-6 ). Pertimbangan pengamatan hari ke-0 dan ke-2 adalah karena rata-rata penderita masuk pada saat demam hari ke-4,<sup>1</sup> merupakan masa kritis yaitu saat terjadinya kebocoran vaskuler dan mulai terjadi peningkatan kadar TGF- $\beta$ 1 plasma. Pertimbangan lain karena kebocoran vaskuler pada DBD berlangsung singkat yaitu dalam 24-48 jam saja, sedangkan parameter kebocoran vaskuler dapat diukur dari pemeriksaan indeks efusi pleura (IEP), pengukuran kadar protein total, kadar albumin dan hematokrit. Pada penelitian yang pernah dilakukan sebelumnya, IEP merupakan indikator kebocoran vaskuler yang sensitif.<sup>1</sup> Terjadinya hemokonsentrasi selama berlangsungnya kebocoran plasma ditandai oleh kenaikan hematokrit, dimana pemeriksaan ini dikerjakan untuk mengevaluasi kebocoran vaskuler yang masih berlangsung dan kecukupan pemberian cairan pada DBD. Pengukuran kadar protein total dan albumin karena selama berlangsungnya proses kebocoran vaskuler protein dan albumin masuk ke dalam ruang *interstitiel* dan menyebabkan hemokonsentrasi. Umur sampel antara 3 – 14 tahun. Umur 14 tahun dipilih karena penelitian ini terbatas pada kasus DBD anak, dan umur 3 tahun

dipilih karena alasan teknis pengambilan sampel darah pada anak umur 3 tahun keatas akan lebih mudah dibanding anak yang lebih kecil.

Peran TGF- $\beta$ 1 produk monosit darah tepi terhadap kebocoran vaskuler sejauh yang kami ketahui belum pernah diteliti. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui korelasi antara kadar TGF- $\beta$ 1 produk monosit darah tepi dengan parameter kebocoran vaskuler yang ditandai oleh hipoproteinemia , hipoalbuminemia, hemokonsentrasi dan efusi pleura kanan.

## **1.2 Perumusan Masalah**

Apakah kadar TGF- $\beta$ 1 produk monosit darah tepi berkorelasi dengan kebocoran vaskuler pada DBD

## **1.3 Tujuan Penelitian**

### **1.3.1 Tujuan Umum**

Membuktikan korelasi TGF- $\beta$ 1 produk monosit darah tepi dengan parameter kebocoran vaskuler pada DBD

### **1.3.2 Tujuan Khusus**

1. Menganalisis korelasi TGF- $\beta$ 1 produk monosit darah tepi dengan protein total pada pengamatan hari ke-0 dan ke-2
2. Menganalisis korelasi TGF- $\beta$ 1 produk monosit darah tepi dengan albumin pada pengamatan hari ke-0 dan ke-2
3. Menganalisis korelasi TGF- $\beta$ 1 produk monosit darah tepi dengan hematokrit pada pengamatan hari ke-0 dan ke-2
4. Menganalisis korelasi TGF- $\beta$ 1 produk monosit darah tepi dengan indek efusi pleura (IEP) pada pengamatan hari ke-0 dan ke-2

#### **1.4 Manfaat Penelitian**

1. Pelayanan Kesehatan

Memberikan pijakan yang kuat, dimana dalam jangka panjang dapat digunakan sebagai pertimbangan pemilihan dan penggunaan imunoterapi yang dapat memodulasi produksi TGF- $\beta$ 1 oleh monosit darah tepi yang dapat digunakan untuk pengelolaan penderita DBD dimasa datang.

2. Pendidikan

Menambah pengetahuan tentang imunopatogenesis penyakit demam berdarah dengue

3. Penelitian

Memberikan pijakan pada penelitian lanjutan yang bertujuan mengetahui lebih rinci mekanisme kerja TGF- $\beta$ 1 produk monosit dalam menyebabkan kebocoran vaskuler pada infeksi virus dengue *in vitro* dan *in vivo*.

#### **1.5 Originalitas Penelitian**

Penelitian yang membuktikan adanya hubungan antara kadar TGF- $\beta$ 1 produk monosit darah tepi dengan kebocoran vaskuler pada penderita DBD belum pernah dilakukan

Beberapa penelitian tentang Hubungan TGF- $\beta$ 1 pada DBD yang pernah dilakukan :

Tahun	Peneliti/Jurnal	Variabel	Desain Penelitian/jumlah sampel	Hasil penelitian
1998	Agarwal R, Elbishbishi EA, Chaturvedi UC, Nagar R, Mustafa AS (International Journal of Experimental Pathology 1999;80: 303-34) <sup>2</sup>	Transforming Growth Factor Beta 1 pada 79 penderita DBD berbagai derajat	Cross sectional	TGF- $\beta$ 1 terdeteksi pada hampir 96% penderita DBD. Kadar TGF- $\beta$ 1 terendah ditemukan pada DD. Kadar TGF- $\beta$ 1 tertinggi pada DBD derajat IV
1998	Laur F, MurgeB, XavierD, Claudine R Oliver C, Eliane C (Trans R Soc Trop Med Hygiene 1998; 92:654-6.) <sup>3</sup>	Kadar TNF- $\alpha$ dan TGF- $\beta$ 1 plasma pada Anak dengan Infeksi Virus dengue 2 di French Polinesia	Cross sectional	Kadar TGF- $\beta$ 1 pada DHF lebih tinggi secara signifikan dibandingkan dengan DF
2006	Azeredo EL, Zagne SMO, Alverenga AR, Nogueira RM, Kubelka CF, Pinto LMO (Mem Inst Oswaldo Cruz. 2006;01(4):437-49) <sup>5</sup>	Peningkatan kadar IL-18, TGF- $\beta$ 1 dan S-ICAM pada outbrake dengue di Brasil 2001-2002	Cross sectional	Peningkatan kadar IL-18, TGF- $\beta$ 1 dan S-ICAM berkorelasi dengan keparahan infeksi dengue
2008	Yan C, Christy SK K, Feng Q L, Vincent CH L, Jonathan R L, Paul KH T (J Leukoc Biol 2008; 83:1-9) <sup>13</sup>	Hambatan sekresi TGF- $\beta$ 1 Makrofag yang distimulasi LPS oleh Inhibitor spesifik reseptor TGF- $\beta$ 1 (SB431542)	Cross sectional	Penurunan sekresi TNF- $\alpha$ akibat hambatan sekresi TGF- $\beta$ 1 oleh inhibitor spesifik reseptor TGF- $\beta$ 1 (SB431542)
2009	Novita wijayanti <sup>14</sup>	Korelasi TGF- $\beta$ 1 plasma dengan Protein Total dan Albumin pada DBD	Observasional analitik	Terdapat korelasi kadar TGF- $\beta$ 1 plasma dengan Protein Total dan Albumin pada pengamatan hari ke-2
2009	Zuhrawardi <sup>15</sup>	Korelasi TGF- $\beta$ 1 plasma dengan Indeks efusi pleura pada DBD	Observasional analitik	Tidak Terdapat korelasi kadar TGF- $\beta$ 1 plasma dengan Indeks efusi pleura

## BAB 2

### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1 Demam berdarah Dengue

Infeksi demam berdarah dengue masih merupakan masalah kesehatan utama di Indonesia. Infeksi dengue merupakan infeksi virus akut yang endemis di daerah tropik dan ditularkan melalui perantara nyamuk, virus dengue termasuk kelompok B Arthropoda borne virus (Arboviruses), genus Flavivirus, famili flaviviridae dan mempunyai 4 jenis serotype yaitu : DEN-1, DEN-2, DEN-3 dan DEN-4. Serotype DEN-3 merupakan serotype yang dominan dan diasumsikan banyak menyebabkan manifestasi klinis yang berat.<sup>16-18</sup>

Menurut teori hipotesis infeksi sekunder heterolog (*the secondary heterologous infection hypotesis*) atau hipotesis *immune enhancement, viral load* memperberat manifestasi klinis infeksi virus dengue.<sup>19</sup> Tinggi titer viremia dapat dihubungkan dengan berat penyakit. Titer tertinggi 100 – 100.000 kali lebih tinggi pada SSD daripada demam dengue.<sup>8</sup> Penelitian oleh Vaughn DW dkk membuktikan bahwa berat DBD mempunyai korelasi dengan tingginya titer viremia.<sup>20</sup> Manifestasi klinis infeksi virus dengue dapat berupa keadaan asimtomatik hingga menimbulkan kematian. Demam simptomatik dapat berupa demam yang tak terdiferensiasikan, Demam Dengue (DD), dan demam berdarah dengue (DBD) yang dapat disertai syok (SSD) dan tanpa syok<sup>22-23</sup>

Diagnosis DBD ditegakkan berdasarkan kriteria WHO 1999:<sup>24</sup>

Kriteria klinis:

- Demam: timbul mendadak, tinggi, terus-menerus, antara 2-7 hari.
- Manifestasi perdarahan: uji *tourniquet* positif, ptekie, purpura, ekimosis, epistaksis, perdarahan gusi, hematemesis dan/atau melena.
- Hepatomegali.
- Tanda-tanda syok : nadi cepat dan lemah dengan tekanan nadi menyempit ( $\leq 20$  mmHg), hipotensi, kulit teraba dingin dan lembab dan penderita jadi tampak gelisah.

Kriteria Laboratoris:

- Trombositopenia ( $\leq 100.000/\text{mm}^3$ )
- Hemokonsentrasi; kenaikan hematokrit sebesar 20% atau lebih.

Ditemukannya 2 kriteria klinis, ditambah adanya trombositopenia dan hemokonsentrasi, atau kenaikan hematokrit cukup untuk menegakkan diagnosis klinis DBD. Adanya efusi pleura dan hipoalbuminemia merupakan bukti telah terjadinya kebocoran vaskuler.

WHO (1999) membagi menjadi empat kategori menurut derajat berat penderita sebagai berikut <sup>24</sup> :

Derajat I : Demam yang disertai gejala konstitusional yang tidak khas, satu- satunya manifestasi perdarahan adalah uji torniquet positif.

Derajat II : Derajat I, disertai perdarahan spontan pada kulit atau perdarahan yang lain.

Derajat III : Terdapat tanda-tanda kegagalan sirkulasi yaitu denyut nadi yang

cepat dan lemah, tekanan nadi menurun atau hipotensi, disertai kulit yang dingin, lembab dan penderita gelisah

Derajat IV : Renjatan (syok) berat dengan nadi yang tidak dapat diraba tekanan darah yang tidak dapat diukur.

## 2.2 Imunopatogenesis demam berdarah Dengue

### 2.2.1 Teori *antibody dependent enhancement* (ADE)

Teori ini memperkirakan proses terjadinya kenaikan replikasi virus pada infeksi sekunder merupakan akibat antibodi yang berkadar rendah dan bersifat subnetral yang terbentuk pada saat terjadi infeksi primer tidak mampu membunuh virus Dengue, sehingga kompleks imun melekat pada reseptor Fc sel mononuklear fagosit (terutama makrofag) mempermudah virus masuk ke sel dan meningkatkan multiplikasi.<sup>25</sup>

### 2.2.2 Teori endotel

Sel monosit yang telah terinfeksi virus dengue akan melepaskan faktor–faktor yang dapat mengaktivasi kultur sel endotel, yaitu *Interleukin–1* (IL–1) dan *Tumor Nekrosis Faktor* (TNF).<sup>9</sup> Faktor–faktor itu dapat menyebabkan efek multipel terhadap endotel, yaitu menekan aktivitas antikoagulan, memacu prokoagulan, dan meningkatkan permeabilitas vaskuler. Pada DBD/SSD, jejas pada endotel terjadi akibat pembentukan kompleks imun dan aktivasi komplemen. Aktivasi sel endotel tidak terjadi secara langsung, tetapi melalui faktor–faktor yang dikeluarkan akibat monosit yang terinfeksi oleh virus dengue. Virus

dengue dapat menginfeksi sel endotel secara *in vitro* dan menyebabkan pengeluaran sitokin dan kemokin, seperti IL-6, IL-8 dan *regulated and activation T cell excretion and secretion* (RANTES). Sel endotel yang terinfeksi virus dengue dapat mengaktifasi sistem komplemen yakni dilepaskannya C3a dan C5a yang merupakan anafilatoksin kuat dalam meningkatkan permeabilitas vaskuler serta menginduksi ekspresi molekul adhesi seperti ICAM-1, *E-selektin*, vWF, *P-selektin* dan sVCAM-1. Ekspresi ICAM-1 bersama-sama dengan IL-8 serta RANTES meningkatkan terikatnya sel polimorfonuklear dan mononukleus pada endotel. Peningkatan permeabilitas vaskuler dan dilepaskannya trombomodulin yang merupakan petanda kerusakan sel endotel.<sup>26</sup> Virus dengue melalui mekanisme tidak langsung, menyebabkan aktivasi endotel. Monosit yang terinfeksi virus dengue mengeluarkan mediator yang menyebabkan aktivasi endotel melalui ekspresi molekul adhesi VCAM-1 dan ICAM-1.<sup>7</sup>

### 2.2.3 Teori endotoksin

Endotoksin sebagai komponen kapsul luar bakteri gram negatif akan mudah masuk ke dalam sirkulasi pada syok dengan keadaan iskemia berat. Endotoksin mengaktifasi kaskade sitokin terutama TNF  $\alpha$  dan IL-1. Telah dibuktikan oleh peneliti sebelumnya bahwa endotoksemia berhubungan erat dengan kejadian syok pada DBD. Endotoksemia terjadi pada 75% penderita SSD dan 50% DBD tanpa syok.<sup>43</sup>

#### 2.2.4 Teori apoptosis

Apoptosis adalah proses kematian sel secara fisiologik yang merupakan reaksi terhadap berbagai stimuli. Proses dibagi menjadi dua tahap sebagai berikut.

1. Kerusakan inti sel.
2. Perubahan bentuk dan membran sel.

Konsekuensi teori apoptosis adalah fragmentasi DNA inti sel, vakuolisasi sitoplasma, pembentukan bleb, dan peningkatan granulasi membran plasma menjadi DNA subselular yang berisi badan-badan apoptotik. Limfosit sitotoksik mengkode protease (granzyme, fragmentasi) yang menginduksi apoptosis sel target. Limfosit yang teraktivasi guna merespons infeksi virus menunjukkan ekspresi Fas dalam kadar tinggi dan sangat rentan terhadap apoptosis.<sup>25,26</sup>

#### 2.2.5 Teori mediator

Beberapa mediator telah diketahui meningkat pada DBD, seperti C3 dan C5. Peningkatan kadar dan lama peningkatan berhubungan dengan terjadinya syok dan berat penyakit. Pada DBD beberapa sitokin dan mediator kimia, yaitu IL-2, IL-6, dan TNF- $\alpha$  meningkat kadarnya, sedangkan IL-1 tidak. Peneliti sebelumnya membuktikan bahwa sitokin berperan dalam patogenesis DBD.

Fungsi dan mekanisme kerja sitokin adalah sebagai mediator pada imunitas alami yang disebabkan oleh rangsang zat infeksius sebagai regulator yang mengatur aktivasi, proliferasi, diferensiasi limfosit, sebagai

aktivator sel inflamasi non spesifik, stimulator pertumbuhan, dan diferensiasi leukosit matur. Teori mediator berkembang sejalan dengan peran endotoksin dan sel limfosit<sup>27</sup>

### 2.3 Hubungan TGF $\beta_1$ dan kebocoran vaskuler pada DBD

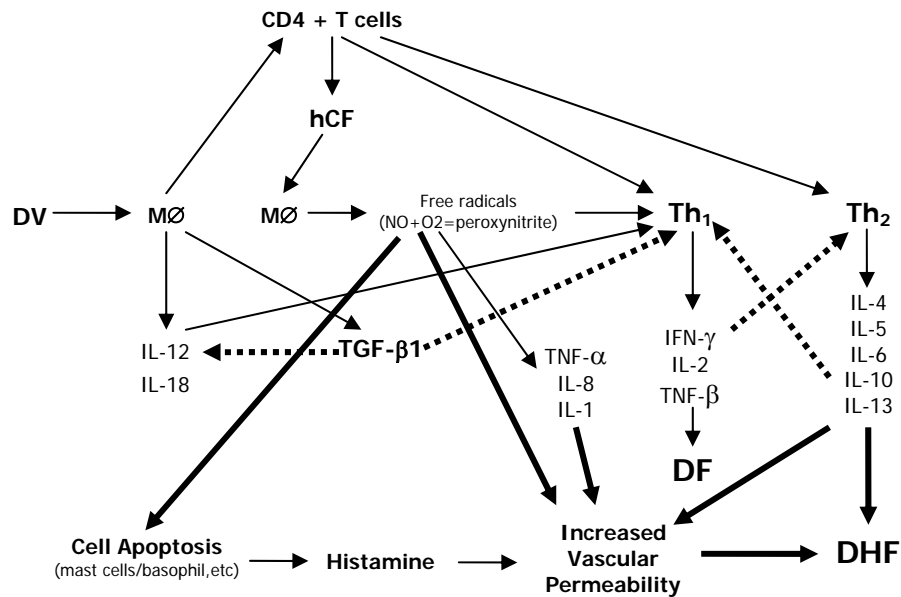
TGF- $\beta_1$  merupakan suatu sitokin polipeptida multifungsi yang disekresikan oleh berbagai macam sel, termasuk diantaranya oleh makrofag, sel *natural killer* (NK), *lymphokine-activated killer cells*, sel B dan sel CD4<sup>+</sup> maupun sel CD8<sup>+</sup>. TGF- $\beta_1$  memiliki efek immunomodulator multipel pada berbagai sel target dan jaringan, menghambat proliferasi sel T dan sel B, menjadi antagonis sitokin-sitokin proinflamasi seperti TNF- $\alpha$  dan IFN- $\gamma$ , memblokir aktivitas *cytotoxic lymphocyte* (CTL) dan menghambat induksi terhadap reseptor IL-1 dan IL-2 sehingga sel-sel tidak responsif terhadap sitokin-sitokin ini. *In vivo*, TGF- $\beta$  menghambat adhesi sel T dan netrofil pada sel-sel endothelial, menghambat aktivasi makrofag dan mengatur ekspresi MHC kelas II pada makrofag. TGF- $\beta_1$  dapat menstimulasi ekspresi molekul-molekul adhesi, memberikan suatu kemotaktik yang kuat bagi sel-sel leukosit dan sel-sel lain yang terlibat dalam respon imun, dan sebaliknya suatu saat dapat pula menghambat bila mereka sudah diaktifkan. Paling tidak ada 5 bentuk *isoform* TGF- $\beta$  yang sudah diketahui, yaitu TGF- $\beta_1$ , TGF- $\beta_2$ , TGF- $\beta_3$ , TGF- $\beta_4$  dan TGF- $\beta_5$ , dengan urutan asam amino sekitar 70-80% adalah homolog. TGF- $\beta_1$  merupakan suatu polipeptida yang tersusun dari 390 asam amino dan gennya dipetakan pada kromosom 19q13. TGF- $\beta_1$  diproduksi oleh limfosit, makrofag, dan sel-sel dendritik, dan ekspresinya dapat bersifat autokrin maupun parakrin dalam mengendalikan diferensiasi,

proliferasi dan aktivasi terhadap sel-sel imun. Produksinya meningkat pada keadaan seperti keganasan, penyakit autoimun dan kondisi kronik lainnya. Ia dapat berperan sebagai sitokin proinflamasi maupun sitokin antiinflamasi tergantung pada konsentrasinya.<sup>28,29</sup> TGF- $\beta$ 1 diaktifkan oleh *acidic microenvironment*, plasmin dan *plasmin like-protease* dan menjadi tidak aktif bila berikatan dengan  *$\alpha$ 2-macroglobulin*.<sup>29</sup>

Karakteristik demam berdarah dengue (DBD) dibanding dengan demam dengue klasik adalah terjadinya kenaikan permeabilitas pembuluh darah sehingga protein (albumin) dan plasma merembes ke luar dari pembuluh darah.<sup>30,31</sup> Perembesan plasma ke luar dari pembuluh darah juga dapat dipantau dari timbulnya cairan dalam ruang serosa (efusi pleura, asites). Kebocoran vaskuler dibuktikan dengan indeks efusi pleura (IEP), hemokonsentrasi, hipoproteinemia, dan hipoalbuminemia terjadi pada DBD dan lebih berat pada SSD.<sup>32,56</sup> Tujuh puluh persen penderita DBD non-syok menunjukkan efusi pleura pada foto polos dada. Pada pasien dengan syok berat, volume plasma dapat berkurang sampai lebih dari 30%.<sup>47</sup> Efusi pleura mempunyai peran penting dan berhubungan bermakna dengan terjadinya syok dan mortalitas. Penelitian yang pernah dilakukan di RS. Dr. Kariadi pada tahun 2004<sup>1</sup>, efusi pleura terdapat pada 80,3% sindrom syok dengue dan 39,7% DBD tanpa syok. Indeks efusi pleura lebih dari 6% mempunyai risiko syok 13,86 kali pada DBD.

TGF- $\beta$ 1 diduga mempunyai peran pada patogenesis DBD. TGF-  $\beta$ 1 plasma dan mRNA TGF-  $\beta$ 1 spesifik dari sel mononuklear darah tepi terdeteksi pada infeksi dengue.<sup>4</sup> Kadar TGF-  $\beta$ 1 plasma ditemukan paling tinggi pada DHF

grade IV.<sup>2,3</sup> TGF-  $\beta$ 1 menginduksi ekspresi molekul adhesi endotel, yang mengakibatkan peningkatan permeabilitas vaskuler dan kebocoran plasma.<sup>3,33</sup>



Gambar 1. Kaskade sitokin pada infeksi dengue

sumber : Caturvedi UC, Agarwal R, Elbishbishi EA, Mustafa AS<sup>4</sup>

Pergeseran respons imunologis dari sel Th-1 menjadi sel T-2 akibat sekresi TGF- $\beta$ 1 oleh monosit yang terinfeksi dengue menghasilkan DBD derajat berat<sup>2,33-35</sup>

Sel endotel vena umbilikal manusia akan teraktivasi setelah dipaparkan monosit yang terinfeksi virus dengue.<sup>9</sup> Aktivasi akan dicapai secara maksimum jika pada kultur monosit yang terinfeksi virus dengue ditambahkan serum yang mengandung imunoglobulin terhadap virus dengue, temuan *in vitro* ini sesuai dengan bukti epidemiologis bahwa reaksi imun awal terhadap virus dengue merupakan faktor risiko utama kejadian DBD.<sup>36</sup> Berdasarkan hipotesis *antibody dependent enhancement* (ADE), monosit merupakan target utama infeksi virus dengue.<sup>9-11,37,38</sup> Sel monosit darah perifer yang terinfeksi virus

dengue mengeluarkan TGF- $\beta$ 1,<sup>4</sup> yang mengaktivasi endotel melalui ekspresi molekul adhesi *vascular cell adhesion molecule* (VCAM-1) dan *intracellular adhesion molecule* (ICAM-1).<sup>33</sup> Peningkatan ICAM-1 dan VCAM-1 telah terbukti berperan dalam aktivasi leukosit dan kebocoran vaskuler. Terdapat hubungan antara meningkatnya bentuk s-VCAM-1 molekul adhesi dengan beratnya DBD.<sup>5,7,33,39</sup>

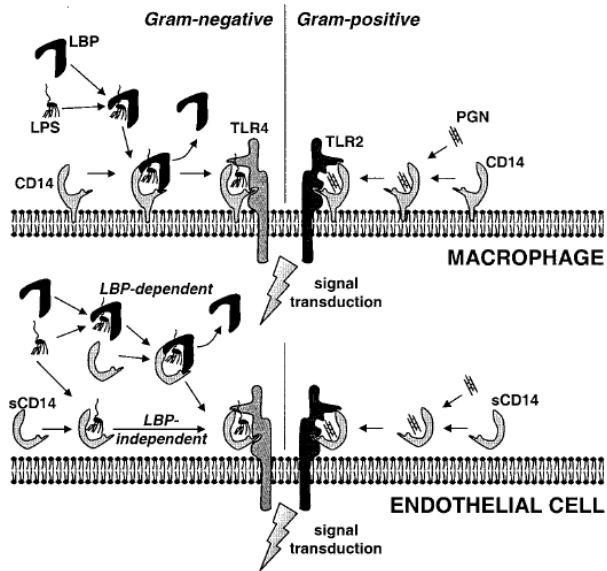
Beberapa teori telah dikemukakan untuk menerangkan patogenesis DBD, yaitu teori virulensi dan beban virus, teori enhancement dependent antibody, teori endotoksin, teori apoptosis dan teori endotel. Semua teori pada akhirnya membahas terjadinya kebocoran vaskuler dan gangguan hemostasis yang merupakan inti dari kelainan utama dan spesifik dari DBD.<sup>39</sup>

Sel endotel kapiler berperan dalam patogenesis DBD dan mulai banyak diteliti secara invitro. Hal ini disebabkan kebocoran vaskuler patognomoni pada DBD dan keadaan ini berkaitan dengan integritas endotel kapiler yang terganggu. Peran dan fungsi endotel pada inflamasi berubah untuk sementara akibat stimulasi sitokin (IL-1, TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8), virus, bakteri, kompleks imun dan aktivasi sel B dan sel T, sehingga menyebabkan aktivasi endotel.<sup>4</sup> Virus dengue melalui mekanisme tidak langsung, menyebabkan disfungsi dan aktivasi endotel.<sup>9</sup> Pada penelitian yang pernah dilakukan dilaporkan bahwa s-VCAM meningkat pada pasien infeksi dengue dan terutama lebih tinggi secara signifikan pada DHF/SSD atau pada fase akut dengan manifestasi lebih berat.<sup>7,40,41</sup> Pada DBD aktivasi platelet dan sitokin, menyebabkan sekresi *Platelet Activating Factor* (PAF). Secara bersama-sama, peningkatan kadar PAF serta TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, IL-8,

C3a, C5a, dan histamin akan menyebabkan disfungsi endotel pembuluh kapiler sehingga terjadi perembesan plasma dan syok hipovolemik, serta perdarahan sebagai akibat gangguan koagulasi.<sup>22</sup> Infeksi virus dengue menyebabkan aktivasi makrofag yang memfagositosis kompleks virus antibodi non netralisasi sehingga sehingga virus bereplikasi di makrofag. Terjadi infeksi monosit oleh virus dengue menyebabkan aktivasi T helper dan T sitotoksik sehingga diproduksi limfokin dan *interferon gamma* (IFN- $\gamma$ ) yang akan mengaktivasi monosit dan sekresi berbagai mediator inflamasi seperti TNF- $\alpha$ , IL-1, *platelet activating factor* (PAF), IL-6 dan histamin yang mengakibatkan terjadinya disfungsi sel endotel dan kebocoran plasma.<sup>42</sup>

#### **2.4 Peran LPS dan monosit pada infeksi Dengue**

Penelitian endotoksemia pada penderita dengue didapatkan kejadian endotoksemia yang berhubungan dengan perjalanan penyakit DBD berat antara lain melalui peningkatan permeabilitas pembuluh darah.<sup>43</sup> Pada penderita DBD tanpa syok telah terdeteksi adanya *lipopolisakarida* (LPS) dalam sirkulasi. Kadar LPS pada SSD lebih tinggi secara bermakna dibandingkan dengan DBD tanpa syok.<sup>43</sup> LPS adalah dinding bakteri gram negatif, bila berada didarah akan menyebabkan endotoksemia. TGF- $\beta$ 1 bersama-sama atau secara terpisah dengan LPS dapat meningkatkan ekspresi I-CAM-1, E-selectin dan VCAM-1.<sup>33</sup>



Gambar 2. Mekanisme stimulasi LPS pada Monosit/makrofag  
 Sumber: Edwin AS, Theo BJC, Johan K<sup>44</sup>

LPS disirkulasi berikatan dengan *lipoproteinsakarida binding protein* (LBP). Komplek LPS-LBP akan berikatan dengan reseptor CD14 pada permukaan monosit/makrofag. Selanjutnya kompleks LPS-CD14 berikatan dengan TLR-4 dan mengaktivasi monosit/makrofag. Monosit/makrofag yang teraktivasi oleh LPS melepaskan TGF- $\beta$ .<sup>45,46</sup>

TGF- $\beta$ 1 mengaktivasi sel endotel melalui peningkatan ekspresi molekul adhesi yang berperan dalam aktivasi leukosit, peningkatan permeabilitas vaskuler dan kebocoran plasma pada DBD.<sup>5,7</sup>

## 2.5. Hubungan status gizi dan DBD

Penelitian mengenai hubungan status gizi dan derajat DBD hasilnya bervariasi. Penderita DBD dengan status gizi kurang mempunyai risiko syok 37,8% sedangkan pada gizi baik dan obesitas masing-masing mempunyai risiko syok 29,9% dan 30,2%. *CFR* (*Case Fatality Rate*) penderita DBD dengan gizi kurang sebesar 0,5% sedangkan pada gizi lebih dan gizi baik masing-masing sebesar 0,4% dan gizi normal

0,07%.<sup>49</sup> Penelitian yang pernah dilakukan di RS dr. Kariadi mendapatkan hal yang sama, dimana SSD lebih banyak ditemukan pada anak dengan status gizi kurang.<sup>1</sup> Hasil penelitian *Case control* pada 272 bayi berumur kurang dari 12 bulan di Bagian Anak rumah sakit Ho Chi Min, Vietnam, tidak didapatkan hubungan antara status gizi dengan derajat beratnya DBD.<sup>50</sup>

Perjalanan alamiah penyakit DBD dipengaruhi oleh respon imun penderita, anak dengan gizi buruk mengalami penurunan respon imun dan gangguan pada fungsi kekebalan tubuh.<sup>49,51</sup> Oleh karena itu pasien gizi buruk tidak diikutsertakan dalam penelitian ini.

## **2.6. Hubungan sepsis dan DBD**

Sepsis dan DBD mempunyai kesamaan dalam respon imunologi, dimana pada sepsis juga terjadi stimulasi yang berlebihan oleh sitokin-sitokin proinflamasi dan mediator-mediator sistemik yang memicu kerusakan dan disfungsi endotel.

Sepsis adalah *SIRS (systemic inflammatory response syndrome)* dengan curiga (*suspected*) atau bukti (*proven*) infeksi.<sup>52</sup>

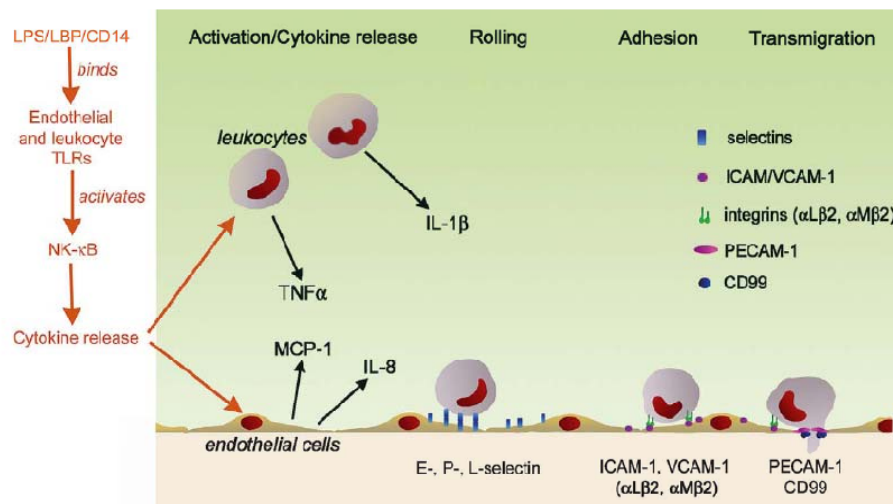
SIRS ditandai oleh sedikitnya 2 keadaan berikut<sup>52</sup> :

1. Temperatur inti  $> 38.5^{\circ}\text{C}$  atau  $< 36^{\circ}\text{C}$
2. Takikardi, rata rata laju denyut jantung  $> 2$  SD diatas nilai normal sesuai umur
3. Rata-rata laju napas  $> 2$  SD diatas nilai normal sesuai umur
4. Hitung leukosit meningkat atau menurun sesuai umur atau neutrofil imatur  $> 10\%$

Pada penelitian ini sepsis dianggap sebagai faktor perancu yang harus dikeluarkan dari penelitian karena memiliki kesamaan dengan DBD dalam respons imunologi. Disamping itu pada sepsis juga terjadi peningkatan kadar TGF- $\beta$ 1 dan kebocoran

vaskuler yang lebih lama dibandingkan DBD yang hanya terjadi dalam 24-48 jam.<sup>53</sup> Sepsis ditandai oleh kerusakan dan disfungsi endotel akibat stimulasi berlebihan dari sitokin dan mediator kimiawi, menyebabkan kebocoran vaskuler dan aktivasi koagulasi, dengan akibat perdarahan, hipovolemia, syok dan disfungsi organ multipel.<sup>54</sup>

Berikut ini adalah gambar yang menjelaskan disfungsi endotel saat terjadinya sepsis



Gambar 3. Interaksi LPS dengan aktivasi endotel pada sepsis.  
 Sumber: Peters K, Unger R E., Brunner J, Kirkpatrick C J<sup>48</sup>

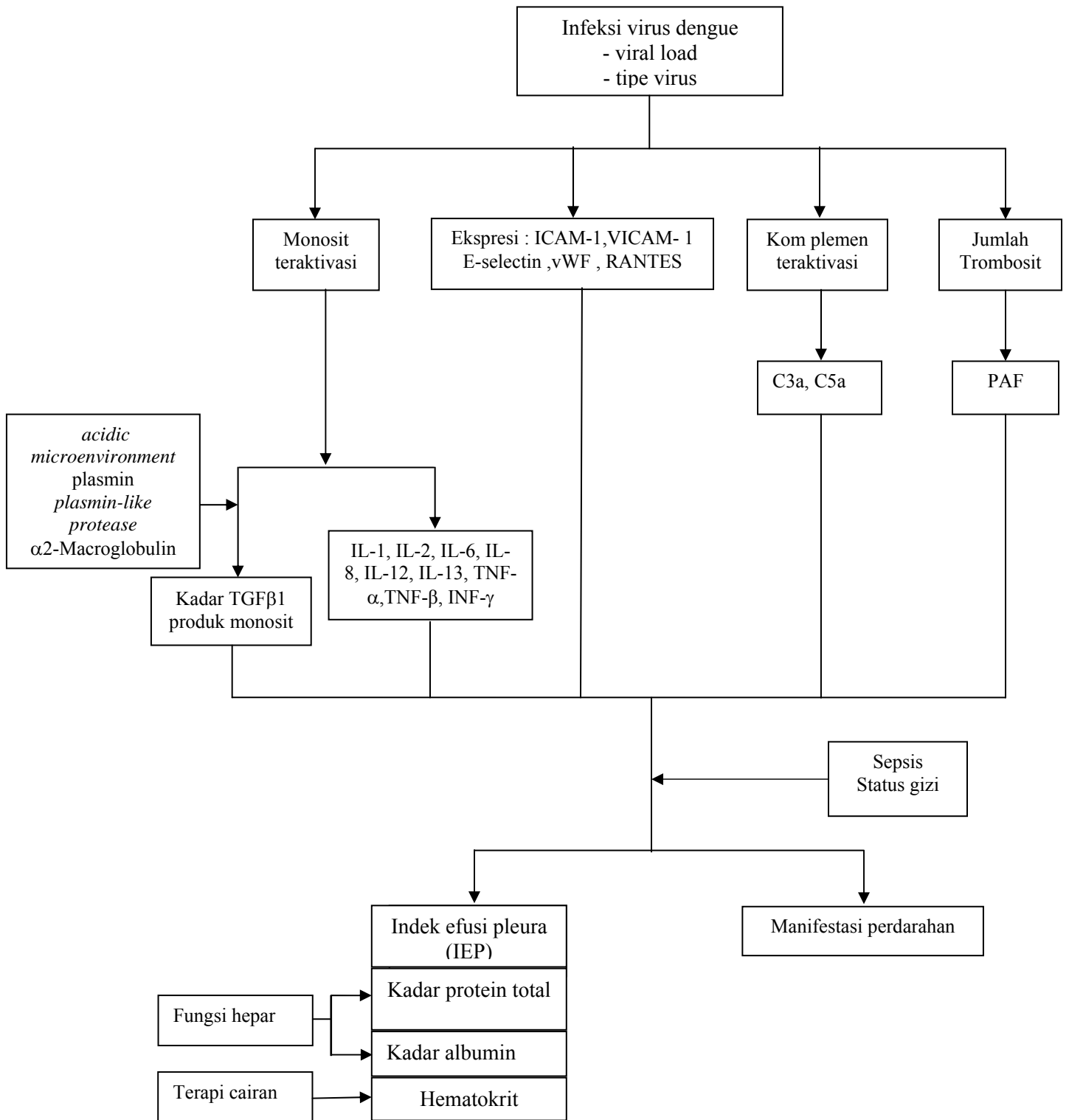
Komplek LBP-LPS dan CD14 mengaktivasi endotel melalui TLR. Kemudian mengaktivasi NF-κβ untuk melepaskan sitokin. Endotel yang teraktivasi akan mengekspresikan molekul adhesi ICAM-1, VCAM-1, PCAM-1, E- selectin, menginduksi peningkatan permeabilitas vaskuler dan mengakibatkan kebocoran vaskuler pada sepsis.

## 2.7 DBD dan manifestasi perdarahan

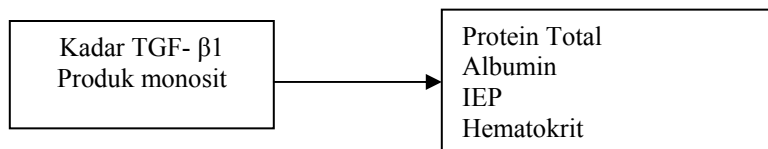
Manifestasi perdarahan, seperti epistaksis, perdarahan ginggiva, perdarahan saluran cerna, dan hematuria diasumsikan karena trombositopenia, vaskulopati, dan koagulopati.<sup>1,8</sup> Perdarahan dapat terjadi sendiri atau merupakan bagian dari gangguan kaskade pembekuan yang kompleks, seperti perdarahan intravaskuler menyeluruh (PIM). Beratnya perdarahan bervariasi, mulai dari tempat suntikan atau tempat pengambilan darah sampai yang umum seperti petekia, purpura, ekhimosis, perdarahan usus, hemoptosis atau bahkan DOM (*disfungsi organ multiple*) karena perdarahan adrenal (*sindroma waterhouse frederichsen*). Pada penyakit perdarahan karena virus seperti DBD, komplikasi perdarahan adalah yang paling sering. Trombositopenia sering terjadi pada infeksi virus umumnya, tetapi kadang-kadang dapat menyebabkan gangguan hemostasis dan komplikasi perdarahan. Mekanismenya adalah penurunan trombopoiesis, pemakaian trombosit yang berlebihan atau kombinasi keduanya. Interaksi langsung virus dengan trombosit dapat menyebabkan trombositopenia atau trombositopati. Jejas pada sel endotel oleh virus menyebabkan peningkatan perlekatan trombosit dan pemakaian trombosit. Trombositopenia merupakan hal yang sering terjadi pada DBD. Akibat penurunan produksi, peningkatan destruksi atau peningkatan pemakaian trombosit yang berhubungan dengan agregasi trombosit. Makin berat trombositopenia, sangat mungkin disebabkan karena pemakaian berlebihan. Demikian pula mekanisme imun berperan dalam trombositopenia pada DBD yang dibuktikan dengan adanya kompleks imun pada permukaan trombosit. PIM dapat terjadi pada kasus berat dengan penyebab yang tersering adalah pemakaian trombosit yang berlebihan. Secara *in vitro* terbukti bahwa

jejas sel endotel oleh virus dengue mengakibatkan agregasi trombosit dan lisis trombosit, kemudian menyebabkan trombositopenia yang berlebihan dan koagulopati konsumtif.<sup>26,39</sup>

## 2.8 Kerangka Teori



## 2.9 Kerangka Konsep



## 2.10 Hipotesis

### 2.10.1 Hipotesis Mayor

Terdapat korelasi kadar TGF- β1 produk monosit darah tepi dengan kebocoran vaskuler pada hari pengamatan ke-0 dan ke-2

### 2.10.2 Hipotesis Minor

1. Terdapat korelasi kadar TGF- β1 produk monosit darah tepi dengan kadar protein total antara hari pengamatan ke-0 dan ke-2
2. Terdapat korelasi antara kadar TGF- β1 produk monosit darah tepi dengan kadar albumin pada hari pengamatan ke-0 dan ke-2
3. Terdapat korelasi antara kadar TGF- β1 produk monosit darah tepi dengan hematokrit
4. Terdapat korelasi antara kadar TGF- β1 produk monosit darah tepi dengan indek efusi pleura (IEP)

## BAB 3

### METODE PENELITIAN

#### **3.1. Ruang Lingkup Penelitian**

Bagian anak RSUP Dr. Kariadi Semarang.

#### **3.2 Tempat dan Waktu Penelitian**

Bangsal HND, PICU Ruang perawatan IRNA C (infeksi) RSUP Dr.Kariadi. Pengukuran kadar sitokin antiinflamasi (TGF- $\beta$ 1) dilakukan di laboratorium CEBIOR FK UNDIP. Penelitian dilakukan mulai bulan Juli 2005 sampai dengan Juli 2006

#### **3.3 Rancangan Penelitian**

Observasional prospektif

#### **3.4 Populasi dan Sampel penelitian**

##### **3.4.1. Populasi target**

Anak berusia 3 sampai 14 tahun yang menderita demam berdarah dengue.

##### **3.4.2. Populasi terjangkau**

Anak berumur 3 sampai 14 tahun yang menderita demam berdarah dengue, dirawat di bangsal IRNA C, PICU dan bangsal HND RSUP Dr. Kariadi Semarang selama periode penelitian.

##### **3.4.3. Sampel penelitian**

Anak berumur 3 sampai 14 tahun yang menderita demam berdarah dengue, yang dirawat di bangsal IRNA C (Infeksi), PICU, dan bangsal HND RSUP Dr. Kariadi Semarang selama periode penelitian yang memenuhi kriteria sebagai berikut:

#### 3.4.3.1 Kriteria Inklusi

1. Pasien yang didiagnosis DBD berumur 3 – 14 tahun
2. Diagnosis ditegakkan dengan dasar kriteria WHO 1999 dan pemeriksaan serologi ELISA
3. Orang tua pasien bersedia untuk mengikutkan anaknya dalam penelitian dan menandatangani *informed consent*
4. BB/PB (% dari persentil ke-50) >70 % dan < 120%.

#### 4.4.3.2. Kriteria eksklusi

1. Dalam perjalanan penyakitnya mengalami sepsis
2. Pasien yang tidak mengikuti sampai selesai atau pemeriksaan darah tidak lengkap atau pindah diluar semarang
3. Orang tua pasien menolak partisipasi

#### 3.4.4. Cara Sampling

Semua pasien yang memenuhi kriteria penelitian diambil sebagai sampel (*consecutive sampling*)

#### 3.4.5. Besar sampel

Sesuai dengan hipotesis penelitian besar sampel dihitung dengan rumus besar sampel untuk uji korelasi.

Tidak didapatkan nilai r dari referensi sebelumnya, sehingga dipakai koefisien korelasi sebesar  $(r) = 0,5$ . Nilai  $Z_{\alpha} = 1,96$  ( $\alpha = 0,05$ ). Nilai  $Z_{\beta} = 0,842$  ( $\beta = 0,2$  untuk power penelitian sebesar 80%). Besar sampel adalah <sup>55</sup>:

$$n = \left[ \frac{Z\alpha + Z\beta}{0,5 \ln \left( \frac{1+r}{1-r} \right)} \right]^2 + 3 = \left[ \frac{1,96 + 0,842}{0,5 \ln \left( \frac{1+0,5}{1-0,5} \right)} \right]^2 + 3 \approx 38$$

Besar sampel yang dibutuhkan minimal 38 orang.

### 3.5 Variabel Penelitian

3.5.1. Variabel Independen : kadar TGF-  $\beta$ 1 produk monosit darah tepi

3.5.2. Variabel dependen :

faktor kebocoran vaskuler : IEP, protein total, albumin dan hematokrit

penderita DBD

### 3.6 Definisi Operasional

Variabel	Definisi operasional	Skala pengukuran
Kadar TGF $\beta$ -1	Kadar TGF $\beta$ -1 monosit darah tepi adalah kadar TGF $\beta$ -1 yang diperiksa menggunakan metode ELISA dan dibaca dengan alat <i>microplate reader</i> , sampel : kultur darah <i>whole blood</i> yang distimulasi dengan LPS  Satuan : pg/ml	Rasio
Kebocoran Vaskuler	Kebocoran vaskuler dinyatakan dengan mengukur IEP, kadar albumin ,protein total dan hematokrit Indeks efusi Pleura adalah perbandingan dalam persen antara lebar efusi pleura kanan (A) dan lebar hermitoraks kanan pada posisi RLD ( <i>right lateral decubitus, B</i> ) Rumus perhitungan IEP = $A/B \times 100\%$ . Kadar protein total plasma adalah kadar protein total yang diperiksa dengan metode <i>Biuret</i> , satuan : gr/dl Kadar albumin plasma adalah kadar albumin yang diperiksa dengan metode <i>Bromocresol-Green</i> , satuan : gr/dl Hematokrit diukur dengan metode <i>QBC, Becton Dickinson ,NJ 07417</i> , satuan : %	Rasio

### 3.7 Cara Pengumpulan Data

1. Penelitian dilakukan di Bangsal HND, PICU, ruang perawatan IRNA C (infeksi)RSUP Dr. Kariadi Semarang mulai tahun 2005 – 2006. Bila memenuhi kriteria penelitian dimintakan persetujuan tertulis dari keluarga (*informed consent*)

2. Pada sampel dilakukan pemeriksaan fisik lengkap dan pemeriksaan kebocoran vaskuler yaitu IEP, albumin, protein total dan Ht. Diagnosis DBD ditegakkan atas dasar kriteria WHO 1999, dikonfirmasi dengan uji serologis Ig M dan Ig G Elisa *captured*
3. Dilakukan pengukuran kadar TGF-  $\beta$ 1 produk monosit darah tepi

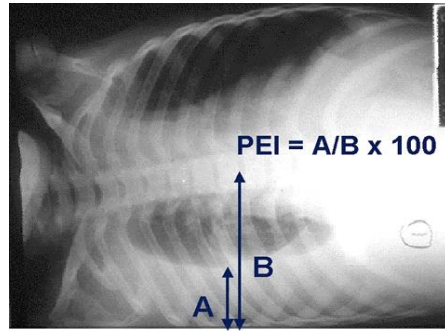
#### **Cara stimulasi monosit darah tepi dengan LPS pada kultur**

1. Siapkan darah tepi dengan antikoagulan EDTA
2. Siapkan *plate* steril 24 sumuran
3. Masukkan RPMI komplet 10% FBS pada tiap sumuran
4. Tambahkan 100  $\mu$ l darah tepi pada satu sumuran
5. Tambahkan 10  $\mu$ l LPS dengan konsentrasi 1mg/ml pada satu sumuran
6. Masukkan pada inkubator CO<sub>2</sub> dg suhu 37°C selama semalam
7. Masukkan supernatan kultur pada tabung eppendorf ukuran 1,5 ml
8. Sentrifus tabung eppendorf pada microcentrifuge
9. Aliquoute supernatan sebanyak 250  $\mu$ l pada tabung eppendorf 0,5 ml, buang endapan.
10. Simpan supernatan pada suhu -80°C.

Peralatan yang dibutuhkan untuk mengukur parameter diatas adalah

1. Alat pengukur kadar TGF-  $\beta$ 1 produk monosit darah tepi yaitu microplate reader, yang berada di laboratorium CEBIOR Fakultas kedokteran UNDIP
2. Alat pengukur kadar albumin dengan metode *Bromocresol-Gren* dan kadar protein total dengan metode *Biuret* berada di laboratorium Patologi Klinik RSUP Dr. Kariadi Semarang

3. Alat pengukur hematokrit dengan metode QBC, Becton Dickinson, NJ 07417 berada di laboratorium Patologi Klinik RSUP Dr. Kariadi Semarang
4. Alat pengukur efusi pleura dinilai dengan indeks efusi pleura (IEP) pada X foto toraks berada di Bagian Radiologi RSUP Dr. Kariadi Semarang



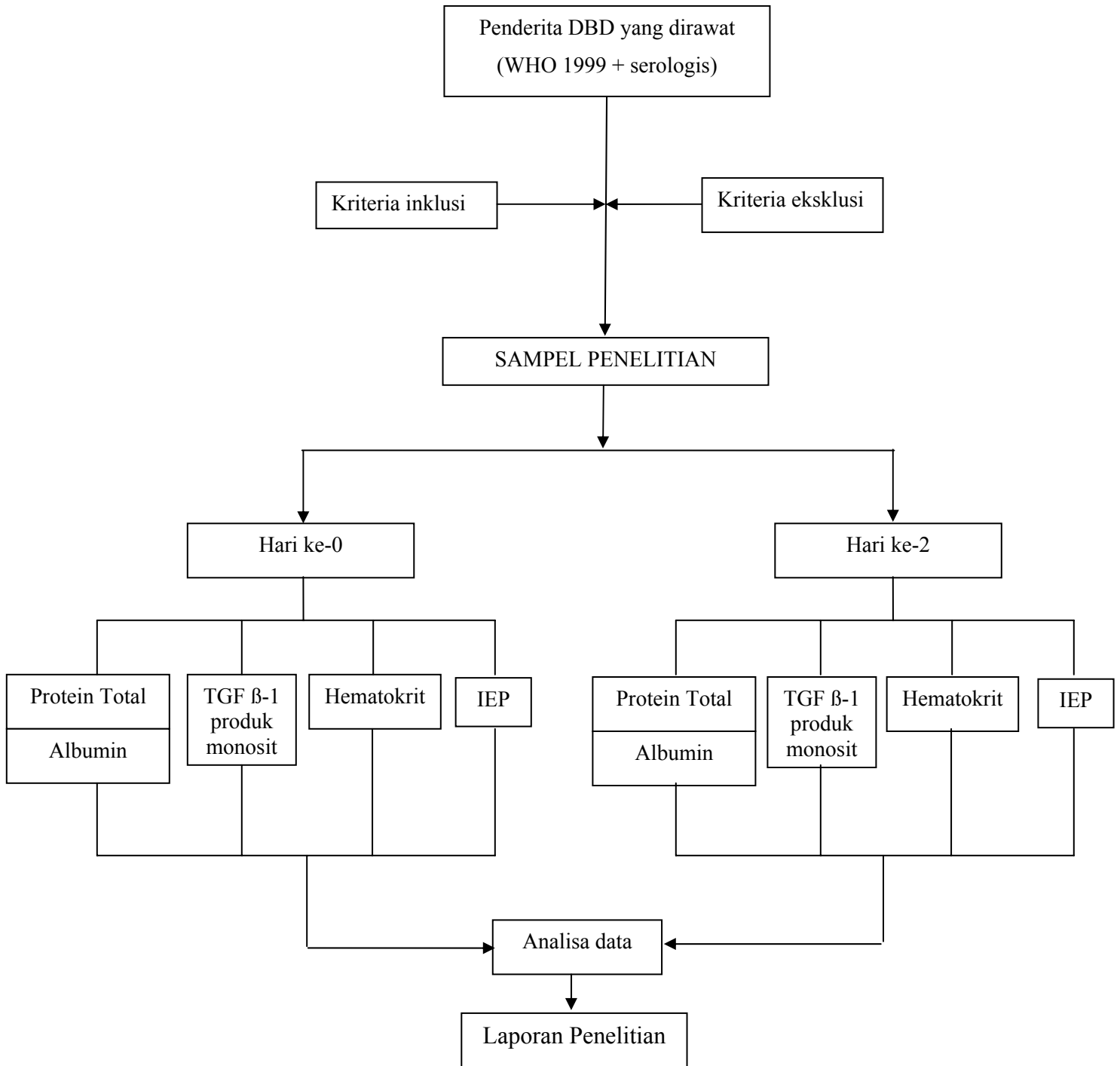
Gambar 4. Penghitungan Efusi pleura

Sumber : Vaughn DW, Green S, Kalayanarooj S, et al<sup>56</sup>

Peralatan yang dibutuhkan untuk kultur sel, isolasi dan penyimpanan supernatan kultur sel adalah :

1. *Laminar flow* berada di laboratorium CEBIOR FK Undip
2. Inkubator CO<sub>2</sub> berada di laboratorium CEBIOR FK Undip.
3. *Deep freeze* berada di laboratorium CEBIOR FK Undip

### 3.8 Alur Penelitian



### 3.9 Analisis Data

#### 3.9.1 Analisis Univariat

1. Dicari kecenderungan sentral dan dispersi ( mean,median,SD persentil) pada setiap variabel karakteristik individu
2. Untuk variabel berskala kategori (nominal dan ordinal) lainnya akan dilakukan analisis distribusi frekuensi, kemudian divisualisasikan dalam bentuk tabel dan diagram

#### 3.9.2 Analisis Bivariat

1. Uji korelasi TGF  $\beta$ -1 produk monosit darah tepi dengan albumin dan total protein
2. Uji korelasi TGF  $\beta$ -1 produk monosit darah tepi dengan IEP
3. Uji korelasi TGF  $\beta$ -1 produk monosit darah tepi dengan hematokrit

Normalitas data TGF- $\beta$ 1, protein total, albumin, IEP dan hematokrit akan diuji dengan uji Kolmogorov-Smirnov. Data dinyatakan berdistribusi normal apabila  $p > 0,05$ .

Korelasi antara kadar TGF- $\beta$ 1 dengan protein total, albumin, IEP dan hematokrit akan dianalisis dengan uji korelasi Pearson bila data berdistribusi normal atau uji korelasi Spearman bila data berdistribusi tidak normal.<sup>57</sup>

Nilai p dianggap bermakna apabila  $p < 0,05$ . Rentang interval kepercayaan yang digunakan adalah 95 %. Analisis data menggunakan program *statistics program for social science v. 15,0* (SPSS Inc, USA).

### 3.10 Etika Penelitian

Penelitian ini merupakan bagian dari penelitian utama yang berjudul "Hubungan disfungsi endotel dengan gangguan hemostasis pada SSD" yang telah mendapatkan persetujuan dari Komite Etik Penelitian Kedokteran Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro/RS. Dr. Kariadi Semarang dengan nomor kode etik 06/EC/FK/RSDK/2001. Persetujuan untuk diikutsertakan dalam penelitian dimintakan dari orang tua penderita secara tertulis dengan menggunakan *informed consent*. Orang tua penderita sebelumnya telah diberikan penjelasan tentang tujuan dan prosedur penelitian. Orang tua berhak menolak untuk diikutsertakan dalam penelitian dengan alasan apapun serta berhak untuk keluar dari penelitian setiap saat. Semua penderita, baik yang menerima maupun menolak ikut penelitian tetap dikelola sesuai protap pengelolaan DBD. Seluruh biaya yang untuk penelitian ditanggung oleh peneliti. Responden tidak dibebani biaya tambahan apapun untuk penelitian. Data pribadi penderita akan dijamin kerahasiaannya.

## BAB 4

### HASIL PENELITIAN

#### 4.1. Karakteristik subyek penelitian

Penelitian ini melibatkan data 42 anak penderita DBD yang menjadi bagian Penelitian Kohort demam berdarah Dengue Indonesia Belanda yang dilaksanakan bulan Juli 2005 sampai dengan Juni 2006. Dari 84 data yang tersedia didapatkan 42 anak yang memiliki data lengkap sehingga dapat dilakukan analisis. Jumlah tersebut masih melebihi jumlah sampel minimal yang diperlukan. Karakteristik subyek penelitian ditampilkan pada tabel 1.

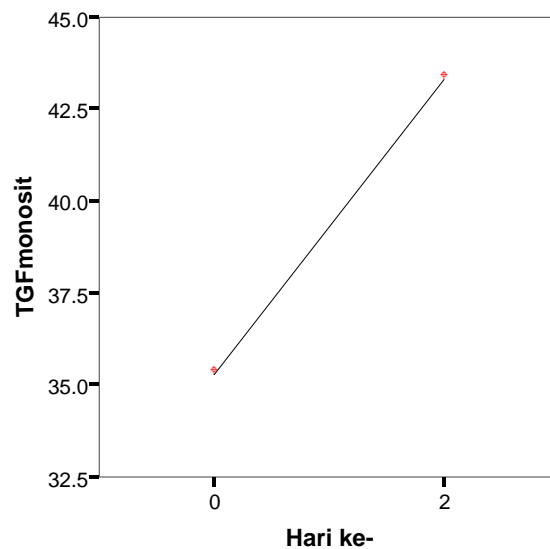
Tabel 1. Karakteristik subyek penelitian (n=42)

Karakteristik	Rerata $\pm$ SB	n (%)
Umur	7,1 $\pm$ 2,43	-
Jenis kelamin	-	-
- Laki-laki	-	14 (33,3%)
- Perempuan	-	28 (66,7%)
Berat badan (kg)	24,6 $\pm$ 18,26	-
Tinggi badan (cm)	120,2 $\pm$ 17,54	-
Onset demam (hari)	3,8 $\pm$ 1,01	-
Lama perawatan (hari)	5,4 $\pm$ 4,07	-

Umur subyek penelitian yang termuda adalah 4 tahun sedangkan umur tertua adalah 13 tahun. Dari 42 subyek penelitian, dijumpai bahwa sebagian besar subyek penelitian adalah wanita. Onset demam terpendek adalah 2 hari dan terlama adalah 6 hari. Sedangkan lama perawatan tersingkat adalah 1 hari dan terlama adalah 9 hari.

#### 4.2. Produksi TGF- $\beta$ monosit

Hasil pengukuran produksi TGF- $\beta$ 1 monosit yang diambil pada hari pengamatan ke-0, setelah distimulasi oleh LPS produksi TGF- $\beta$ 1 adalah  $35.27 \pm 34.642$  pg/ml (median=33,96). Sedangkan produksi TGF- $\beta$ 1 monosit yang diambil pada pengamatan hari ke-2, setelah distimulasi LPS adalah  $43.29 \pm 28.012$  pg/ml (median=41.355). Hasil pengukuran tersebut menunjukkan terjadinya peningkatan produksi TGF- $\beta$ 1 monosit pada pengamatan hari ke-2. Walaupun hasil uji statistik menunjukkan bahwa peningkatan tersebut tidak bermakna ( $p=0,09$ ; uji Wilcoxon) Peningkatan produksi TGF- $\beta$ 1 monosit tersebut ditampilkan pada gambar 5.



**Gambar 5. Kadar TGF- $\beta$  monosit penderita dengue (n=42) pada hari ke-0 dan hari ke-2 pengamatan.**

#### 4.3. Pengukuran parameter kebocoran vaskuler

Hasil pengukuran parameter kebocoran vaskuler ditampilkan pada tabel 2.

Tabel 2. Parameter kebocoran vaskuler pada subyek penelitian (n=42)

Parameter kebocoran vaskuler	Rerata		SB		Median		Min		Max	
	Hari ke-0	Hari ke-2	Hari ke-0	Hari ke-2	Hari ke-0	Hari ke-2	Hari ke-0	Hari ke-2	Hari ke-0	Hari ke-2
IEP (%)	12,6	24,7	(12,58)	(16,37)	10,0	20,6	0,0	3,1	50,0	90,0
Hematokrit (%)	37,8	36,0	(6,98)	(4,70)	38,2	36,5	13,7	25,5	50,0	44,6
Protein total (g/L)	5,5	6,1	(1,07)	(0,94)	5,6	6,1	3,4	4,0	8,4	8,8
Albumin (g/ L)	3,3	3,5	(0,66)	(0,49)	3,4	3,4	1,9	2,4	4,9	4,8

Min= minimum= nilai terendah

Max= maximum= nilai tertinggi

Tabel 2 menunjukkan bahwa terjadi peningkatan IEP yang bermakna pada hari ke-2 ( $p < 0,001$ ). Selain itu pada hari ke-2 juga dijumpai adanya peningkatan yang bermakna pada kadar protein total ( $p = 0,002$ ). Berbeda dengan IEP, hematokrit pada hari ke-2 terjadi penurunan, akan tetapi secara statistik penurunan tersebut tidak bermakna ( $p = 0,2$ ). Selain itu juga dijumpai peningkatan kadar albumin pada hari ke-2, akan tetapi peningkatan tersebut juga tidak bermakna ( $p = 0,1$ ).

#### 4.4. Korelasi antara TGF- $\beta$ monosit dengan parameter kebocoran plasma

Hasil uji korelasi kadar TGF- $\beta$  monosit dengan parameter kebocoran plasma pada hari perawatan ke-0 dan ke-2 ditampilkan pada tabel 3

Tabel 3. Korelasi antara kadar TGF- $\beta$  monosit dengan parameter kebocoran vaskuler subyek penelitian (n=42) pada hari pengamatan ke-0

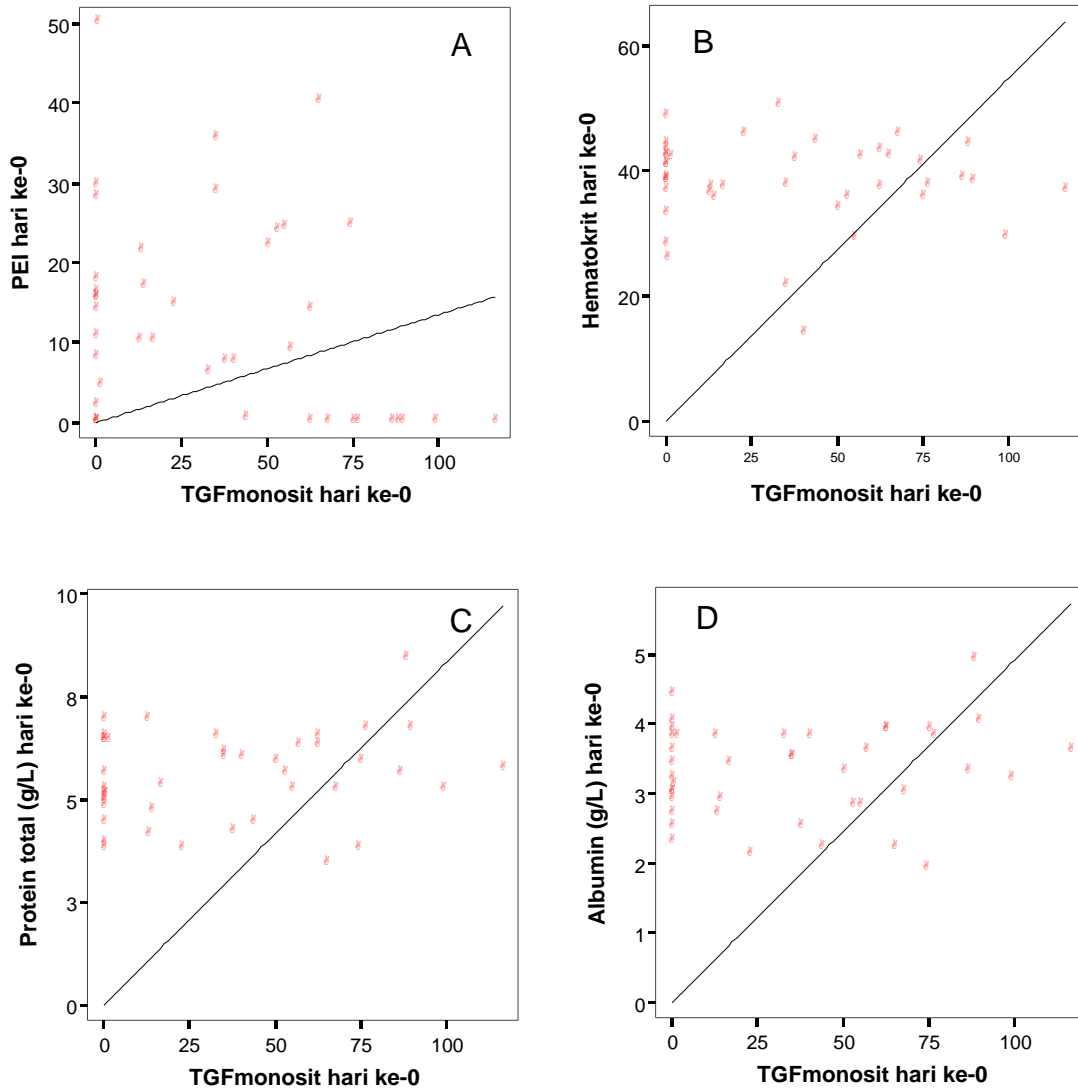
Parameter kebocoran vaskuler hari ke-0	Koefisien korelasi	p
Indeks Efusi Pleura	- 0,31	0,04
Hematokrit	- 0,08	0,6
Protein total	0,19	0,2
Albumin	0,11	0,5

Tabel 3 menunjukkan pada hari pengamatan ke-0 dijumpai korelasi yang bermakna antara TGF- $\beta$ 1 monosit dengan IEP, sedangkan korelasi antara TGF- $\beta$ 1 dengan hematokrit, protein total dan albumin serum adalah tidak bermakna.

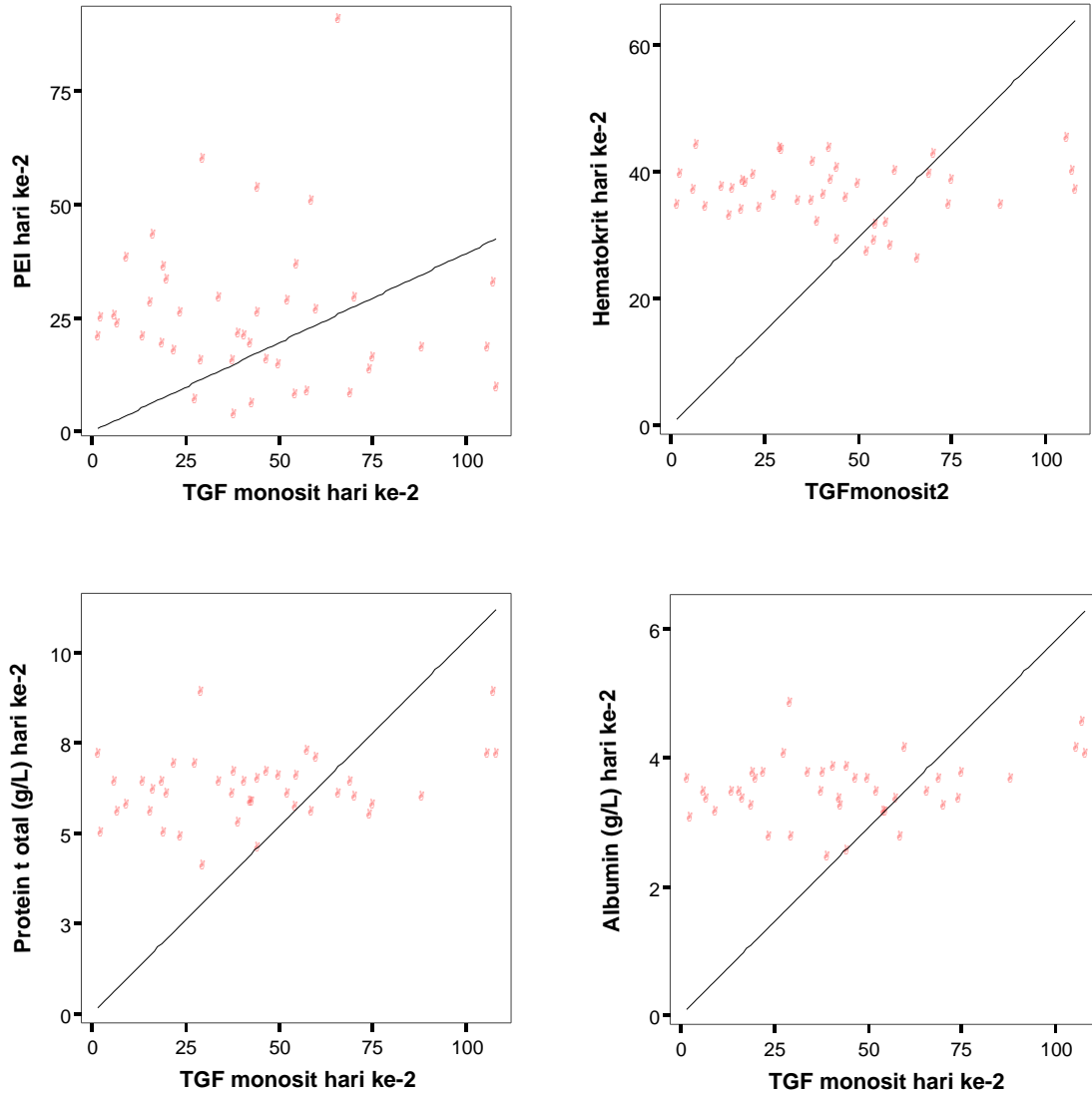
Tabel 4. Korelasi antara kadar TGF- $\beta$ 1 monosit dengan parameter kebocoran vaskuler subyek penelitian (n=42) pada hari pengamatan ke-2

Parameter kebocoran vaskuler hari ke-2	Koefisien korelasi	p
Indeks Efusi Pleura	-0,2	0,3
Hematokrit	-0,04	0,8
Protein total	0,2	0,2
Albumin	0,2	0,2

Tabel 4 menunjukkan pada hari pengamatan ke-2 , korelasi antara TGF- $\beta$ 1 monosit dengan IEP, hematokrit, protein total dan albumin serum adalah tidak bermakna.



Gambar 6. Korelasi antara TGF-monosit dengan IEP (panel A), hematokrit (panel B), protein total (panel C) dan albumin (panel D) subyek penelitian pada hari ke-0 perawatan.



**Gambar 7. Korelasi antara TGF-monosit dengan IEP (panel A), hematokrit (panel B), protein total (panel C) dan albumin (panel D) subyek penelitian pada hari ke-2 perawatan.**

## BAB 5

### PEMBAHASAN

Mekanisme yang melibatkan sitokin proinflamasi dan antiinflamasi pada patogenesis kebocoran vaskular DBD masih belum dimengerti dengan jelas. Belum banyak penelitian yang menghubungkan secara langsung tentang peran sitokin pada parameter kebocoran vaskular pada DBD. *Transforming Growth Factor Beta 1* (TGF- $\beta$ 1) adalah salah satu sitokin yang diduga mempunyai peran pada patogenesis DBD. Pada penelitian yang pernah dilakukan tentang peran TGF- $\beta$ 1 pada patogenesis DBD, didapatkan bahwa kadar TGF- $\beta$ 1 yang meningkat sesuai durasi sakit dan tingkat keparahan penderita infeksi dengue serta diduga adanya peran TGF- $\beta$ 1 terhadap mekanisme kebocoran vaskular pada DBD.<sup>2-5</sup>

Penelitian yang dilakukan oleh M. Juffrie dkk<sup>58</sup>, menyatakan adanya korelasi antara IL-8 dengan manifestasi ascites, efusi pleura pada DBD ( $p < 0,05$ ). Sedangkan penelitian di Polinesia terhadap 52 anak yang positif terinfeksi dengue, pada fase awal perawatan (hari ke 1-3 demam) didapatkan kadar TGF- $\beta$ 1 pada plasma secara bermakna lebih tinggi pada kelompok DBD daripada kelompok demam dengue (DD).<sup>3</sup> Penelitian pada 79 anak dengan berbagai derajat manifestasi klinis infeksi dengue, didapatkan bahwa TGF- $\beta$ 1 plasma dan mRNA TGF- $\beta$ 1 terdeteksi pada hampir semua penderita infeksi dengue (96%) dan kadar TGF- $\beta$ 1 plasma ditemukan paling tinggi pada DBD derajat IV. Kadar TGF- $\beta$ 1 plasma mulai terdeteksi pada awal perjalanan penyakit, secara bertahap meningkat dan mencapai kadar puncak setelah hari ke-9.<sup>2</sup> Penelitian Elzinandes L Azeredo dkk,<sup>5</sup> menyatakan bahwa kadar TGF- $\beta$ 1 pada penderita DBD lebih

tinggi jika dibandingkan dengan kontrol yang sehat ( $p < 0,0175$ ). Tetapi pada 3 penelitian ini tidak mengkorelasikan peran TGF- $\beta$ 1 dengan parameter kebocoran vaskuler pada DBD.

### 5.1 Kadar TGF- $\beta$ 1 monosit

Pada penelitian ini, kadar TGF- $\beta$ 1 produk monosit darah tepi yang distimulasi dengan LPS, mengalami peningkatan pada pengamatan hari ke-2 bila dibandingkan dengan pengamatan hari ke-0, walaupun secara statistik peningkatannya tidak bermakna ( $p = 0,09$ ; Uji *Wilcoxon*). Karena jumlah sampel minimal dalam penelitian ini dihitung menggunakan rumus uji korelasi untuk sampel tunggal, maka hasil uji beda ini hanya sebagai wacana dan temuan awal saja. Kiranya masih perlu dilakukan penelitian lain dengan sampel yang lebih besar sehingga nantinya dapat diambil kesimpulan yang dapat diproyeksikan pada populasi. Penelitian kami hanya membatasi pengukuran kadar TGF- $\beta$ 1 pada 2 hari pengamatan saja (hari ke-0 dan ke-2), sehingga belum bisa menggambarkan kinetika TGF- $\beta$ 1 selama perjalanan penyakit DBD sebaik penelitian Agarwal dkk, karena memang fokus penelitian ini adalah untuk mengetahui kemungkinan pengaruh TGF- $\beta$ 1 terhadap kebocoran plasma yang teoritis pada DBD terjadi dalam waktu yang singkat, yaitu antara 24-48 jam, sehingga hanya diukur pada 2 hari pertama sejak diagnosa ditegakkan dimana diperkirakan kebocoran plasma terjadi.

### 5.2 Korelasi TGF- $\beta$ 1 dengan parameter kebocoran vaskuler

Pada pengamatan hari ke-0, didapatkan korelasi negatif lemah antara TGF- $\beta$ 1 monosit dengan IEP ( $\rho = -0,31$ ,  $p < 0,05$ ). Hal ini dapat dianggap sebagai temuan awal yang mengindikasikan kemungkinan adanya efek protektif TGF- $\beta$ 1 pada kasus DBD.

Kemungkinan adanya efek protektif ini sangat beralasan mengingat TGF- $\beta$ 1 dapat berperan sebagai sitokin proinflamasi maupun anti-inflamasi. Sedangkan pada pengamatan hari ke-2 ( hari sakit ke-6) kadar TGF- $\beta$ 1 produk monosit tidak berkorelasi dengan IEP dikarenakan kebocoran vaskuler pada hari sakit ke-6 sudah berhenti dan bahkan mungkin sudah mulai terjadi fase *repooling* awal, dimana mulai terjadi pergeseran cairan dari ekstrasvaskuler kembali ke intravaskuler. Kebocoran vaskuler pada DBD berlangsung singkat 24-48 jam.<sup>24</sup>

Pada penelitian ini didapatkan korelasi yang tidak bermakna antara TGF- $\beta$ 1 dengan hematokrit baik pada pengamatan hari ke-0 maupun dengan pengamatan hari ke-2 , hal ini dikarenakan hematokrit merupakan parameter kebocoran vaskuler yang kurang sensitif , sangat dipengaruhi oleh pemberian cairan dan mungkin diasumsikan bahwa kenaikan kadar TGF- $\beta$ 1 turut memberi andil memperbaiki kebocoran vaskuler sehingga plasma tidak terus menerus keluar, bahkan kembali masuk lagi ke intravaskuler karena kebocoran vaskuler sudah mengalami perbaikan.

TGF- $\beta$ 1 produk monosit darah tepi tidak berkorelasi dengan kadar protein total dan albumin baik pada pengamatan hari ke-0 maupun pada hari pengamatan ke-2, hal ini mungkin dapat diasumsikan bahwa TGF- $\beta$ 1 turut memberi andil memperbaiki kebocoran vaskuler sehingga protein total dan albumin tidak terus menerus keluar, bahkan kembali masuk lagi ke intravaskuler karena kebocoran vaskuler sudah mengalami perbaikan pada fase *repooling*, Sehingga didapatkan kadar protein total dan albumin yang meningkat pada pengamatan hari ke-2.

Penelitian yang pernah dilakukan sebelumnya tentang endotoksemia pada DBD mendapatkan bahwa pada penderita DBD tanpa syok telah terdeteksi adanya

*lipopolisakarida* (LPS) dalam sirkulasi. Endotoksemia terjadi pada 75% penderita SSD dan 50% DBD tanpa syok.<sup>43</sup> LPS akan berikatan dengan CD14 dan menstimulasi monosit/makrofag untuk mensekresi TGF- $\beta$ 1.<sup>46</sup> Penelitian yang dilakukan oleh Kenichi dkk,<sup>59</sup> membuktikan bahwa TGF- $\beta$ 1 menghambat ekspresi reseptor CD-14 pada permukaan monosit/makrofag melalui inhibisi *activation protein-1* (AP-1). Hambatan ekspresi reseptor CD-14 ini diikuti oleh penurunan kadar IL-1 $\beta$  dan TNF- $\alpha$  yang merupakan sitokin proinflamasi. Keadaan seperti ini diasumsikan juga terjadi pada DBD, dimana TGF- $\beta$ 1 akan menghambat ekspresi reseptor CD14 pada permukaan monosit/makrofag, sehingga LPS tidak dapat berikatan dengan reseptor CD14 pada permukaan monosit/makrofag dan mengakibatkan terjadinya penurunan sekresi sitokin proinflamasi oleh monosit/makrofag. Peran TGF- $\beta$ 1 produk monosit darah tepi sebagai protektif terhadap DBD pada penelitian ini merupakan temuan awal, dimana diperlukan penelitian lebih lanjut untuk mengukur reseptor CD14 pada permukaan monosit/makrofag yang diasumsikan jumlahnya menurun karena pengaruh TGF- $\beta$ 1.

Keterbatasan dalam penelitian ini adalah kita tidak dapat mengendalikan faktor yang mengaktifkan TGF- $\beta$ 1 seperti *acidic microenvironment*, plasmin, *plasmin-like protease* dan  *$\alpha$ 2-macroglobulin* yang membuat TGF- $\beta$ 1 tidak aktif. Sedangkan untuk melihat kinetik dari TGF- $\beta$ 1 serta korelasinya, tidak dilakukan pemeriksaan pada hari ke-7 (hari ke-9 sakit), dimana pada hari ini merupakan puncak kadar TGF- $\beta$ 1.

## BAB 6

### SIMPULAN DAN SARAN

#### 6.1 Simpulan

- a. Terdapat korelasi negatif bermakna kadar TGF- $\beta$ 1 produk monosit darah tepi dengan IEP pada hari pengamatan ke-0
- b. Tidak terdapat korelasi bermakna antara kadar TGF- $\beta$ 1 produk monosit darah tepi dengan IEP pada pengamatan hari ke-2.
- c. Tidak terdapat korelasi bermakna antara kadar TGF- $\beta$ 1 produk monosit darah tepi dengan protein total, albumin dan hematokrit pada hari pengamatan ke-0 dan hari pengamatan ke-2

#### 6.2 Saran

1. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut tentang korelasi TGF- $\beta$ 1 monosit darah tepi dengan reseptor CD14 untuk melihat pengaruh inhibisi TGF- $\beta$ 1 monosit terhadap ekspresi reseptor CD14 pada penderita infeksi dengue.
2. Pemeriksaan hari ke-0 mewakili fase awal terjadinya kebocoran vaskuler, hari ke-2 mewakili fase awal *repooling*, maka pada penelitian lanjutan sebaiknya juga dilakukan pemeriksaan pada hari ke-7 (sesuai hari sakit ke-9) untuk mewakili fase penyembuhan, agar didapatkan gambaran kinetik TGF- $\beta$ 1 plasma pada DBD yang jauh lebih baik.

3. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut *cut of point* kadar TGF- $\beta$ 1 monosit yang berperan sebagai antiinflamasi dan proinflamasi.

## DAFTAR PUSTAKA

---

- 1 Setiati TE. Faktor hemostasis dan faktor kebocoran vaskular sebagai faktor diskriminan untuk memprediksi syok pada DBD. Disertasi, UNDIP 2004
- 2 Agarwal R, Elbishbishi EA, Chaturvedi UC, Nagar R, Mustafa AS. Profile of Transforming Growth Factor Beta 1 in patients with dengue haemorrhagic fever. *Int J Exp Pathol* 1999;80: 303-34.
- 3 Laur F, Murge B, Deparis X, Roche C, Cassar O, dan Chungue E. Plasma levels of tumor necrosis factor alpha and transforming growth factor beta-1 in children with dengue virus infection in French Polynesia. *Trop Med Hyg* 1998; 92:654-6.
- 4 Caturvedi UC, Agarwal R, Elbishbishi EA, Mustafa AS. Cytokine cascade in dengue hemorrhagic fever : implications for pathogenesis. *Immunol Med Microbiol* 2000;28(3):183-8.
- 5 Azeredo EL, Zagne SMO, Alvarenga AR, Nogurea RM, Kubelka CF, Pinto LMO. Activated peripheral lymphocytes with increased expression of cell adhesion molecules and cytotoxic markers are associated with dengue fever disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2006;01(4):437-49
- 6 Caturvedi UC, Nagar R, Shrivastava R. Macrophage & dengue virus: Friend or foe? *Indian J Med Res* 2006; 124:23-40
- 7 Murge B, Cassar O, Deparis X. Plasma concentrations of sVCAM-1 and severity of dengue infections. *J. Virol.* 2001;65:97-104.
- 8 Lei HY, Yeh TM, Liu HS, Lin YS, Chen SH, Lin CC. Immunopathogenesis of dengue virus infection. *J Biomed Sci* 2001;8;377-88.
- 9 Robert A, Songli W, Carla O, Andrew C, Issecutz. Activation of endothelial cell via antibody enhanced dengue virus infection of peripheral blood monocytes. *J. Virol.* 1997;42:26-32
- 10 Seema, Jain SK. Molecular mechanism of pathogenesis of dengue virus : Entry and fusion with target cell. *Indian J Clin Biochem.* 2005;20 (2):92-103
- 11 Halstead SB, Heinz FX, Barrett ADT, Roehrig JT. Dengue virus :molecular basis of cell entry and pathogenesis. *Vaccine.* 2005;23:849-56

- 
- 12 Lee YR, Liu MT, Lei HY, Liu CC, Wu JM, Tung YC, et al. MCP-1, a highly expressed chemokine in dengue haemorrhagic fever/dengue shock syndrome patients, may cause permeability change, possibly through reduced tight junctions of vascular endothelium cells. *J Virol* 2006 ( 87); 3623–30
  - 13 Yan C, Christy S, Kam K, Feng QL, Yan L, Vincent C H L, Jonathan RL, Paul KHT. LPS-induced up-regulation of TGF- $\beta$ 1 receptor 1 is associated with TNF- $\alpha$ 1 expression in human monocyte-derived macrophages.
  - 14 Novita W. Korelasi TGF- $\beta$ 1 plasma dengan Indeks efusi pleura pada demam berdarah Dengue. Observasional analitik .Tesis. Semarang: Bagian Ilmu Kesehatan Anak FK UNDIP, 2008
  - 15 Zuhrawardi. Korelasi TGF- $\beta$ 1 dengan kadar protein total dan albumin pada demam berdarah Dengue. Observasional analitik. Tesis. Semarang: Bagian Ilmu Kesehatan Anak FK UNDIP, 2009
  - 16 Soedarmo SP. Masalah demam berdarah dengue di Indonesia. Dalam: Hadinegoro SR, Satari HI, penyunting. Demam berdarah dengue. Jakarta: Balai penerbit FKUI. 2002: 1-12
  - 17 Chaudhry S, Swaminathan S, Khanna. Viral genetics as a basis of dengue pathogenesis. *Dengue Bulletin*. 2006;30:121-31
  - 18 Messer WB, Gubler DJ, Harris E, Sivananthan K, Silva AM. Emergence and global spread of a dengue serotype 3, subtype III virus. *Emerging Infect. Dis.* 2003;9 (7) : 8001-9
  - 19 Guglani L, Kabra SK. T cell immunopathogenesis of dengue virus infection. *Dengue Bulletin* 2005;29:58-69
  - 20 Vaughn DW, Green S, Kalayanarooj S. Dengue Viremia Titer, Antibody Response Pattern and Virus Serotype Correlate with Severity. *J Infect Dis* 2000; 181: 2 – 9.
  - 21 Soedarmo SP, Demam berdarah dengue pada anak. Jakarta: Penerbit Universitas Indonesia; 1988
  - 22 Hadinegoro SRH, Soegiyanto S, Wuryadi S, Suroso T. Tatalaksana demam berdarah dengue. Jakarta : Departemen Kesehatan RI. 2006:2-3

- 
- 23 Setiati TE, Soemantri AG, Anggoro DBS, Bukit P. Severe dengue haemorrhagic fever in Dr. Kariadi Hospital – Semarang, Central Java. Konggres Ilmu Kesehatan Anak X, Bukittinggi, 1996 .
  - 24 WHO regional office for South East Asia. Prevention and control of dengue and dengue hemorrhagic fever, comprehensive guidelines. WHO regional publication, SEARO 29,1999.
  - 25 Sutaryo. Patogenesis dengue dalam : Dengue. Medika FK-UGM. 2004;1:65-96
  - 26 Avirutnan P, Malasit P, Seliger B. Dengue virus infection of human endothelial cells leads to chemokines production, complement activation and apoptosis. J. Immunol. 1998; 161 : 6338 – 46
  - 27 Meer VD, Juffrie M, Suharti C. Levels of soluble Fas in Children with dengue virus infection. Crit. Care and Shock 2001; 4 (3) : 152 – 6.
  - 28 Hernandez-Pando R, Orozco H, Arriaga EK, Sampieri A, Larriva-Sahd J, Madrid V. Analysis of the local kinetics and localization of interleukin-1a, tumor necrosis factor-a and transforming growth factor-b, during the course of experimental pulmonary tuberculosis. Immunology 1997;90:607-17
  - 29 Flanders CK, Burmester JK. Medical application of Transforming Growth Factor- $\beta$  . Clin Med Res 2003; 1 : 13-20
  - 30 Gubler DJ. Dengue and dengue haemorrhagic fever. Clin Microbiol Rev 1998; 11(Suppl 3):480–96.
  - 31 Rigau PJG, Clark GC, Gubler DJ, Reiter P, Sanders EJ, Vorndam AV. Dengue and dengue heamorrhagic fever. Lancet 1998; 352:971–7.
  - 32 Kan EF, Rampengan TH. Factors associated with shock in children with dengue hemorrhagic fever. Paediatrica Indonesiana 2004;44:171-5
  - 33 Kang YH, Brummel SE, Lee CH. Differential effects of transforming growth factor beta-1 on lipopolysaccharide induction of endothelial adhesion molecules. Shock.1999;6:118-25.
  - 34 Mabalirajan U, Kadiravan T, Sharma SK, Banga A, Ghosh B. Short report: Th<sub>2</sub> immune respon in patient with dengue during devertescence : Preliminary evidence. Am J Trop Med Hyg 2005;72(6):783–5

- 
- 35 Mustafa AS , Elbishbishi EA, Agarwal R, Chaturvedi UC. Elevated levels of interleukin-13 and IL-18 in patients with dengue hemorrhagic fever. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2001;30: 229-33
- 36 Soe T, Aung MM, Shwe NT. Risk factors in dengue shock syndrome. *Am J Trop Med Hyg* 1997;56:566-72.
- 37 Lin YW, Wang KJ, Lei HY, Lin YS, Yeh TM, Liu HS, et al. Virus replication and cytokine production in dengue virus-infected human B lymphocytes. *J Virol* 2002: 12242–9
- 38 Warke RV. Molecular dissection of the cellular response to dengue virus infection (Dissertation). University of Massachusetts Graduate School of Biomedical Sciences. 2008
- 39 Setiati TE. Pengelolaan syok pada demam berdarah dengue anak. Dalam : Sutaryo, Hagung P, Mulatsih S, editor. Tatalaksana syok dan perdarahan pada demam berdarah dengue. Yogyakarta: Medika Fakultas Kedokteran UGM. 2004: 75-86.
- 40 Bosch I, Xhaja K, Estevez L, Raines G, Metichar H, Warke RV, et al. Increased production of interleukin-8 in primary human monocytes and in human epithelial and endothelial cell lines after dengue virus challenge. *J Virol* 2002; 76:11.
- 41 Koraka P, Morgue B, Deparis X, Van G, Setiati TE, Osterhaus ADME, et al. Elevation of soluble VCAM-1 plasma levels in children with acute dengue virus infection of varying severity. *J Med Virol* 2004;72: 445-50
- 42 Kurane I, Ennis FA. Cytokines in dengue virus infections : Role of cytokines in the pathogenesis of dengue haemorrhagic fever. *J Virol* 1994; 5: 443 – 8
- 43 Hadinegoro SRS. Telaah endotoksemia pada perjalanan penyakit demam berdarah dengue: perhatian khusus pada syok, produksi TNF- $\alpha$ , interleukin 6 sebagai faktor prediktor demam berdarah dengue berat [dissertation]. Jakarta: Universitas Indonesia. 1996.
- 44 Edwin AS, Theo BJC, Johan K. Receptors, mediators and mechanisms involved in bacterial sepsis and septic shock. *Clin Microbiol Rev* 2003: 379-414
- 45 Byrne A, Reen DJ. Lipopolysaccharide induces rapid production of IL-10 by monocytes in the presence of apoptotic neutrophils. *J Immunol* 2002;168: 1968–77

- 
- 46 Ashcroft GS. Bidirectional regulation of macrophage function by TGF- $\beta$ . *Microbes Infect.* 1999;1:1275
- 47 Sunarto. Keseimbangan cairan asam dan basa. Dalam : Sutaryo, Hagung P, Mulatsih S, penyunting. Tatalaksana syok dan perdarahan pada demam berdarah dengue. Yogyakarta: Medika Fakultas Kedokteran UGM. 2004: 55-64
- 48 Peters K, Unger RE., Brunner J, Kirkpatrick CJ. Molecular basis of endothelial dysfunction in sepsis. *Cardiovasc Res* 2003;60:49–57
- 49 Kalayanarooj S, Nimmannitya S. Is dengue related to nutritional status ? *J Med Thai* 2003;86 (3):673-80
- 50 Hung NT, Lan NT, Lei HY, Lin YS, Halsted SB, Lien LB, et al. Association between sex, nutritional status, severity of dengue hemorrhagic fever and immune status, severity of DHF and immune status in infant with DHF. *Am J Trop Med Hyg* 2005;72(4): 370–4
- 51 Pichainarong N, Mongkalangoon N, Kalayanarooj S, Chaveepojnkamjorn W. Relationship between body size and severity of dengue hemorrhagic fever amongs children aged 1-14 years. *Southeast Asian J Trop Med Pub* 2006; 37(2):283-8.
- 52 Goldstein B, Giroir B, Randolph A. International pediatric sepsis consensus conference: Definitions for sepsis and organ dysfunction in pediatric. *Pediatr Crit Care* 2005;6:2-8
- 53 Marie C, Cavaillon JM, dan Losser MR. Elevated levels of circulating Transforming Growth Factor- $\beta$  1 in patients with the sepsis syndrome. *Annals of Internal Med* 1996;125(6):520-521
- 54 Horn DL, Morrison DC, Opal SM, Silverstein R, Visvanathan K, Zabriskie JB. What are the microbial components implicated in the pathogenesis of sepsis? *Clinic Infec Dis.* 2000; 31:851–8
- 55 Madiyono B, Moeslichan S, Sastroasmoro S, Budiman I, Purwanto I. Perkiraan besar sample. In: Sastroamoro S, Ismael S. *Dasar-dasar metodologi penelitian klinis.* 2<sup>nd</sup> ed. Jakarta: Sagung Seto;2002:259-87
- 56 Vaughn DW, Green S, Kalayanarooj S. Dengue in the early febrile phase: viremia and antibody responses. *J Infect Dis* 1997; 176:322-30

- 
- 57 Dahlan MS. Statistika untuk kedokteran dan kesehatan. Jakarta: Arkans entertainment and education. 2004: 161-8
58. Juffrie M, Meer GM. , Hack CE, Haasnoot K, Sutaryo, Veerman AJP, Thijs LG. Inflammatory mediators in dengue virus infection in children : Interleukin-6 and its relation to CRP and secretory phospholipase A2. *Am J Trop Med Hyg* 2001; 65(1) : 70–5
59. Imai K, Takeshita A, Hanazawa S. Transforming growth factor- $\beta$  inhibits lipopolysaccharide-stimulated expression of inflammatory cytokines in mouse macrophages through downregulation of activation protein 1 and CD14 receptor expression. *Infection and Immunity* ; 2000: 2418–23