

DISFUNGSI ENDOTEL PADA DEMAM BERDARAH DENGUE

Rahajuningsih Dharma¹, Sri Rezeki Hadinegoro² dan Ika Priatni¹

1. Departemen Patologi Klinik, Fakultas Kedokteran, Universitas Indonesia, Jakarta 10430, Indonesia

2. Departemen Ilmu Kesehatan Anak, Fakultas Kedokteran, Universitas Indonesia, Jakarta 10430, Indonesia

E-mail: setiabudy@cbn.net.id

Abstrak

Demam berdarah dengue (DBD) adalah penyakit yang ditandai dengan demam dan perdarahan. Selain itu terdapat efusi pleura yang diduga karena peningkatan permeabilitas vaskular. Berdasarkan tanda tersebut, diduga disfungsi endotel memegang peranan dalam patogenesis demam berdarah dengue. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui apakah pada demam berdarah dengue terjadi disfungsi endotel dengan memeriksa kadar sVCAM-1, von Willebrand factor dan petanda aktivasi koagulasi yaitu D dimer. Di samping itu ingin diketahui apakah ada hubungan antara petanda disfungsi endotel dengan beratnya penyakit. Desain penelitian ini potong lintang, kelompok kasus terdiri atas 31 penderita DBD dan kelompok kontrol terdiri atas 30 penderita demam bukan DBD. Kadar sVCAM-1 diperiksa dengan cara ELISA, vWF dengan cara *enzyme linked fluorescent assay* (ELFA) dan D-dimer dengan cara *sandwich enzyme immunoassay*. Hasil penelitian menunjukkan bahwa rerata kadar sVCAM-1 pada kelompok DBD dan kelompok kontrol berturut-turut adalah 1323 ng/mL dan 1003 ng/mL, sedangkan simpang bakunya berturut-turut 545 ng/mL dan 576 ng/mL. Rerata kadar vWF pada kelompok DBD dan kontrol berturut-turut 284% dan 327%, dengan simpang baku berturut-turut 130% dan 141%. Kadar sVCAM-1 tidak berkorelasi dengan jumlah trombosit, kadar albumin, kadar D dimer dan beratnya penyakit. Terdapat korelasi lemah antara kadar vWF dengan D dimer dan beratnya penyakit. ($r = 0,472$ dan $r = -0,450$). Kesimpulan: Hasil pemeriksaan sVCAM-1, vWF dan D dimer menunjukkan bahwa pada DBD terjadi disfungsi endotel. Namun tidak ada hubungan antara sVCAM-1 dengan beratnya penyakit, hanya ada hubungan yang lemah antara vWF dengan D dimer maupun beratnya penyakit.

Abstract

Endothelial Dysfunction in Dengue Hemorrhagic Fever. Dengue hemorrhagic fever (DHF) is characterized by fever, bleeding, and pleural effusion which may be caused by increased vascular permeability. Based on these findings it is assumed that endothelial dysfunction plays a role in the pathogenesis of DHF. The aims of this study was to know whether endothelial dysfunction occurs in DHF by measuring sVCAM-1, vWF, and D dimer. The relationship between endothelial dysfunction and severity of the disease would also be analyzed. This was a cross sectional study which involved 31 DHF patients and 30 non DHF fever patients as control group. The level of sVCAM-1 was determined by ELISA method, vWF by enzyme linked fluorescent assay, and D dimer by sandwich enzyme immunoassay. The results indicated that mean of sVCAM-1 level in DHF group and control group were 1323 ng/mL and 1003 ng/mL, while standard deviation (SD) were 545 ng/mL and 576 ng/mL respectively. The mean of vWF level in DHF group and control group were 284% and 327%, with SD 130% and 141% respectively. The level of sVCAM-1 did not correlate with platelet count, albumin level, D dimer level and severity of disease. There was a weak correlation between vWF level with D dimer and severity of disease ($r = 0,472$ and $r = -0,450$). Conclusion: The results of this study indicate that endothelial dysfunction occurs in DHF, but there is no correlation between sVCAM-1 with severity of disease, only a weak correlation between vWF with D dimer and severity of disease is found.

Keywords: dengue hemorrhagic fever, endothelial dysfunction

1. Pendahuluan

Demam berdarah dengue (DBD) telah menjadi masalah kesehatan bukan hanya di Indonesia tetapi di juga di negara lain di Asia Tenggara^{1,2}. Selama tiga sampai lima tahun terakhir jumlah kasus DBD telah meningkat

sehingga Asia Tenggara menjadi wilayah hiperendemis¹. Sejak tahun 1956 sampai 1980 di seluruh dunia kasus DBD yang memerlukan rawat inap mencapai 350 000 kasus per tahun sedang yang meninggal dilaporkan hampir mencapai 12 000 kasus². Penyakit ini disebabkan oleh virus dengue yang

merupakan anggota genus *Flavivirus* dari famili *Flaviviridae*^{3,4}. Terdapat 4 serotipe virus dengue yang disebut DEN-1, DEN-2, DEN-3 dan DEN-4^{3,5,6}. Oleh karena ditularkan melalui gigitan artropoda maka virus dengue termasuk arbovirus. Vektor DBD yang utama adalah nyamuk *Aedes aegypti*^{7,8}. DBD merupakan bentuk berat dari infeksi dengue yang ditandai dengan demam akut, trombositopenia, netropenia dan perdarahan. Permeabilitas vaskular meningkat yang ditandai dengan kebocoran plasma ke jaringan interstitiel mengakibatkan hemokonsentrasi, efusi pleura, hipoalbuminemia dan hiponatremia yang akan menyebabkan syok hipovolemik^{4,9}.

Mekanisme terjadinya peningkatan permeabilitas vaskular dan perdarahan pada DBD belum diketahui dengan jelas¹⁰. Pada otopsi kasus DBD tidak dijumpai adanya infeksi virus dengue pada sel endotel kapiler. Pada percobaan *in vitro* dengan kultur sel endotel, ternyata sel endotel akan mengalami aktivasi jika terpapar dengan monosit yang terinfeksi virus dengue¹⁰. Diduga setelah virus dengue berikatan dengan antibodi maka kompleks ini akan melekat pada monosit karena monosit mempunyai Fc receptor^{3,4}. Oleh karena antibodi bersifat heterolog, maka virus tidak dinetralkan sehingga bebas melakukan replikasi di dalam monosit. Monosit akan menghasilkan sitokin yang akan menyebabkan sel endotel teraktivasi sehingga mengekspresikan molekul adhesi seperti vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) dan intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1)^{3,10,11}. Peningkatan TNF- α dan IL-6 pada DBD telah dilaporkan oleh Hadinegoro¹². Sedangkan Suharti menemukan peningkatan TNF- α , IL-1 β dan IL-1Ra pada DBD³. Pada infeksi yang berat ekspresi VCAM-1 pada sel endotel berlebihan sehingga dilepaskan ke dalam sirkulasi dalam bentuk terlarut (soluble VCAM-1). Jadi molekul adhesi terlarut merupakan petanda aktivasi atau kerusakan endotel¹¹. Sitokin juga dapat menimbulkan berbagai perubahan pada fungsi sel endotel yaitu peningkatan sekresi faktor von Willebrand (vWF), *tissue factor* (TF), *platelet activating factor* (PAF), *plasminogen activator inhibitor* (PAI) prostasiklin (PGI₂), dan *nitric oxide* (NO) serta penurunan *tissue plasminogen activator* (tPA) dan trombomodulin^{13,14}. Oleh karena itu pada disfungsi endotel terjadi peningkatan permeabilitas vaskular dan aktivasi sistem koagulasi. Salah satu petanda aktivasi sistem koagulasi adalah peningkatan kadar D-dimer yang merupakan hasil degradasi fibrin oleh plasmin.

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui apakah pada DBD terjadi disfungsi endotel dengan memeriksa kadar sVCAM-1 dan vWF serta D-dimer. Di samping itu juga ingin diketahui apakah terdapat hubungan antara disfungsi endotel dengan beratnya penyakit.

2. Metode Penelitian

Penelitian ini dikerjakan dengan desain potong lintang dan subyek penelitian adalah pasien demam yang dirawat di RS Dr Cipto Mangunkusumo, RS Persahabatan dan RS Budhi Asih Jakarta. Kelompok DBD terdiri atas 30 pasien DBD yang diagnosis nya dibuat berdasarkan kriteria WHO dan hasil tes HI menunjukkan infeksi dengue sekunder, kelompok kontrol terdiri atas 31 pasien demam bukan DBD dengan hasil tes HI negatif atau infeksi dengue primer. Menurut kriteria WHO 1999 diagnosis DBD ditegakkan jika terdapat minimal 2 gejala klinik ditambah 1 dari 2 kelainan laboratorium¹⁵. Gejala klinik DBD dapat berupa demam, perdarahan, pembesaran hati dan syok. Pada DBD, demam tinggi mendadak dan terus menerus selama 2-7 hari. Manifestasi perdarahan dapat berupa perdarahan kulit atau mukosa seperti misalnya petekiae, ekimosis, epistaksis, melena atau uji torniket positif. Kelainan laboratorium pada DBD adalah trombositopenia dengan jumlah trombosit < 100 000/uL dan hemokonsentrasi berupa peningkatan nilai hematokrit pada fase akut $\geq 20\%$ dari nilai konvalesen¹⁵. Hipertensi dan diabetes mellitus merupakan kriteria tolakan karena pada kedua keadaan ini terjadi disfungsi endotel.

Pada fase akut yaitu saat pasien masuk rumah sakit diambil darah vena sebanyak 7 ml yang kemudian dibagi 3 yaitu, 0,5 ml dimasukkan ke tabung berisi K₃EDTA untuk pemeriksaan hitung trombosit dan hematokrit, 1,8 ml dimasukkan ke tabung berisi natrium sitrat dan sisanya ke tabung tanpa antikoagulan. Tabung sitrat dan tabung tanpa antikoagulan disentrifus, plasma sitrat dibagi 2 dan disimpan pada suhu -20°C untuk pemeriksaan D dimer dan kadar vWF. Serum dibagi 3 disimpan pada suhu -20°C untuk pemeriksaan kadar albumin, sVCAM-1 dan tes HI. Pada fase konvalesen yaitu saat keluar rumah sakit diambil darah 2,5 ml yaitu 0,5 ml untuk pemeriksaan nilai Ht dan 2 ml untuk tes HI kedua. Tes HI dikerjakan pada serum fase akut dan konvalesen secara paralel. Untuk pemeriksaan HI jarak pengambilan serum I dan II minimal 5 hari.

Pemeriksaan hitung trombosit dan nilai Ht dikerjakan dengan alat hitung sel darah otomatis Cell-dyn 3700, kadar albumin serum diperiksa dengan metode *Bromcresol-green*¹⁶ dengan alat analisa kimia otomatis Hitachi 737. Nilai normal kadar albumin berkisar antara 3,8 – 5 g/dL dan disebut hipoalbuminemia jika kadarnya <3,8 g/dL. Pemeriksaan sVCAM-1 dikerjakan dengan prinsip *sandwich enzyme immunoassay*¹⁷ menggunakan kit dari R&D system no. kat BBE 3 yang terdiri atas:

1. *microplate* sVCAM-1 yang sudah dilapisi dengan *murine monoclonal antibody* terhadap *human* sVCAM-1.

2. konjugat sVCAM-1 terdiri atas antibodi poliklonal domba yang dikonjugasi dengan horseradish peroxidase.
3. *lyophilized recombinant human sVCAM-1* untuk standar
4. *lyophilized human sVCAM-1* untuk kontrol
5. larutan substrat tetramethylbenzidine
6. larutan asam sebagai stop solution
7. larutan dapar pencuci
8. *conjugate diluent*
9. *sample diluent*
10. *adhesive plate sealers*

Prosedur pemeriksaan¹⁷.

1. Ke dalam masing-masing sumur dimasukkan 100 μ L larutan konjugat
2. Ditambahkan 100 μ L larutan standar, kontrol atau sample yang akan diperiksa.
3. Sumur ditutup dengan *adhesive plate sealers* dan diinkubasi pada suhu kamar selama 90 menit.
4. Larutan dalam sumur dibuang dengan cara menghisap larutan kemudian dicuci dengan menambahkan masing-masing 300 μ L buffer pencuci pada tiap sumur. Pencucian diulangi sampai 6 kali, lalu sumur dikeringkan dengan cara membalikkannya di atas kertas tissue.
5. Ditambahkan 100 μ L substrat pada tiap sumur, lalu sumur ditutup dengan *adhesive plate sealers* yang baru dan diinkubasi pada suhu ruang selama 20 menit.
6. Kemudian ditambahkan 100 μ L *stop solution*.
7. Serapan masing-masing sumur dibaca dalam 30 menit dengan *microplate reader* pada λ 450 nm yang dikoreksi pada λ 620 nm.

Nilai normal sVCAM-1 berkisar antara 395 – 714 ng/mL¹⁷, sehingga kadar sVCAM-1 dikatakan meningkat jika kadarnya >714 ng/mL

Pemeriksaan kadar vWF dikerjakan dengan prinsip *Enzyme Linked Fluorescent Assay* (ELFA)¹⁸ yang mirip dengan ELISA tetapi bedanya substrat yang dipakai mengandung 4-methyl-umbelliferyl phosphate, sehingga jika dipecah oleh enzim menghasilkan produk yang berfluoresen. Fluoresensi diukur pada λ 450 nm. Intensitas fluoresen sebanding dengan kadar vWF dalam sample.

Untuk pemeriksaan vWF dipakai reagen Vidas vWF bioMerieux dengan no katalog 762249901 yang berisi:

1. von Willebrand Factor *reagent strips* siap pakai, terdiri atas 10 sumur. Sumur pertama terbuka untuk memasukkan sample dan 9 sumur lainnya tertutup dengan aluminium foil. Sumur no. 2, 3 dan 4 kosong. Sumur no. 5 berisi konjugat yang mengandung antibody monoklonal vWF yang berlabel fosfatase alkali dalam buffer TRIS. Sumur

6, 7 dan 8 berisi buffer TRIS untuk mencuci. Sumur no 9 berisi diluent yaitu buffer TRIS dan *calf serum*. Sumur terakhir adalah kuvet yang berisi substrat 4 methyl-umbelliferyl phosphate dan merupakan tempat pembacaan fluorometrik.

2. von Willebrand factor *solid phase receptacle* (vWF SPR) adalah fase padat yang sudah dilapisi dengan antibody monoklonal terhadap vWF, SPR ini bertindak sebagai tip untuk memindahkan sample.
3. Kontrol vWF, dilarutkan dengan 1 mL pelarut. Setelah dilarutkan, kontrol ini tetap stabil selama 14 hari pada suhu 2-8°C atau 3 bulan pada suhu -25 – 6°C.
4. Kalibrator vWF, dilarutkan dengan 1 mL pelarut. Setelah dilarutkan, kontrol ini tetap stabil selama 14 hari pada suhu 2-8°C atau 3 bulan pada suhu -25 – 6°C.
5. Sample diluent adalah buffer TRIS dengan pH 7,4 yang mengandung *calf serum* dan sodium azide.
6. *Master lot data entry* (MLE) berupa kertas karton yang berisi barcode dari kit, dipakai tiap kali ganti lot.

Prosedur kerja¹⁸

1. Mula-mula sample, kalibrator maupun kontrol dikocok dengan mixer agar homogen.
2. Kemudian sample diencerkan dengan cara mencampur 25 μ L sample dengan 100 μ L *sample diluent*, dicampur sampai homogen.
3. Ke dalam sumur pertama dari strip dimasukkan 100 μ L kontrol atau sample yang sudah diencerkan.
4. Strip dan SPR diletakkan ke dalam alat Vidas sesuai dengan tempatnya.
5. Alat Vidas dioperasikan sesuai prosedur, dengan memasukkan faktor pengenceran, alat akan bekerja secara otomatis.
6. Hasil pemeriksaan akan tercetak pada kertas print out.

Nilai normal kadar vWF berkisar antara 50 – 150%, sehingga vWF dikatakan meningkat jika kadarnya >150%.

Pemeriksaan D-dimer dikerjakan dengan cara *immunometric flowthrough*.¹⁹ Mula-mula plasma sample diteteskan ke dalam lubang pada kartu. Setelah plasma menyerap ke dalam kartu, molekul D-dimer akan menempel pada membrane yang dilapisi antibody monoklonal spesifik untuk D-dimer. Kemudian ditambahkan konjugat yang mengandung *ultra-small gold-antibody particles*. D-dimer akan berikatan dengan konjugat dengan reaksi sandwich. Konjugat yang berlebihan dibuang dari membran dengan larutan pencuci. Jika terdapat D-dimer, membran tampak kemerahan, intensitas warna sesuai dengan kadar D-dimer. Reagen yang digunakan adalah Nycocard D-dimer dari Nycomed dengan no. catalog 10102146 yang terdiri atas:

1. Kartu tes, setiap kartu terdiri atas 6 lubang, terdapat membrane berpori yang telah dilapis antibody anti D-dimer.
2. R1 Conjugate mengandung antibody anti D-dimer dengan *ultra-small gold particles*.
3. R2 washing solution adalah larutan dapar dengan pH 8,0
4. Kontrol positif mengandung fibrin degradation product.

Prosedur pemeriksaan D-dimer¹⁹:

1. Ke dalam lubang tes pada kartu diteteskan 50 µL washing solution dan dibiarkan meresap.
2. Ke dalam tempat tes ditambahkan 50 µL sample atau kontrol dibiarkan meresap. Sampel harus meresap dalam waktu kurang dari 45 detik.
3. Ke dalam tempat tes ditambahkan 50 µL konjugat dan dibiarkan meresap. Konjugat harus meresap dalam waktu kurang dari 45 detik.
4. Ke dalam tempat tes ditambahkan 50 µL washing solution dan dibiarkan meresap.
5. Hasil dibaca dalam waktu 2 menit dengan menggunakan NycoCard reader.

Nilai normal D-dimer adalah ≤ 300 ng/mL,¹⁹ dikatakan meningkat jika kadarnya >300 ng/mL.

Sebelum dilakukan pemeriksaan terhadap bahan penelitian, dilakukan uji ketelitian dan ketepatan untuk hitung trombosit, albumin, sVCAM-1, vWF dan D dimer dengan bahan kontrol masing-masing parameter.

3. Hasil dan Pembahasan

Pada uji ketelitian within run dan between day untuk hitung trombosit dengan kontrol rendah, normal dan tinggi diperoleh nilai CV berkisar antara 2,65% sampai 4,63%, sedang pada uji ketepatan, penyimpangan (d) berkisar antara 0,19% sampai 11,9%. Untuk kadar albumin diperoleh CV berkisar antara 0,32% sampai 2,81%, sedang d berkisar antara -5,79% sampai 0,25%. CV untuk sVCAM-1 adalah 1,2% dengan d berkisar antara -2,3% sampai 0,37%. Untuk kadar vWF diperoleh CV 4,48% dengan d berkisar antara -12,7 sampai -3,14%, sedang pada uji ketelitian dan ketepatan untuk kadar D-dimer diperoleh CV 4% dengan d berkisar antara -4,5% sampai +4,5%. Hasil ini menunjukkan bahwa nilai yang diperoleh pada penelitian ini dapat dipercaya.

Pada penelitian ini yang memenuhi kriteria ada 30 pasien DBD dan 31 pasien demam bukan DBD. Kelompok DBD terdiri atas 11 lelaki dan 19 perempuan dengan usia termuda 4 tahun dan tertua 29 tahun, yang terbanyak dewasa muda dengan usia > 18 tahun. Pada laporan penelitian Muchlas-triningsih dkk. tahun 1992 di Jakarta jumlah penderita DBD terbanyak adalah

berusia 10-15 tahun, dan yang kedua usia 15 – 20 tahun²⁰.

Menurut WHO penyakit DBD dapat dikelompokkan atas 4 derajat¹⁵. Pada derajat I manifestasi kliniknya demam disertai gejala tidak khas. Satu satunya manifestasi perdarahan adalah uji torniket positif. Pada pemeriksaan laboratorium dijumpai trombositopenia dan/ atau hemokonsentrasi. Derajat II manifestasi klinik seperti derajat I disertai perdarahan spontan di kulit dan/atau perdarahan yang lain. Pada derajat III didapatkan kegagalan sirkulasi yaitu nadi cepat dan lembut, tekanan nadi menurun (≤ 20 mm Hg) atau hipotensi dan sianosis di sekitar mulut. Pada derajat IV dijumpai syok berat dengan nadi tidak teraba dan tekanan darah tidak terukur. Terdapat 12 orang (40%) digolongkan DBD derajat I, 12 orang (40%) derajat II, 5 orang (16,7%) derajat III dan 1 orang (3,3%) derajat IV. Pada pemeriksaan tes HI pada kelompok DBD, 22 serum memberi hasil positif dengan antigen DEN-1, 15 serum positif dengan antigen DEN-2 dan 27 serum positif dengan antigen DEN-3. Jadi ada serum pasien yang memberi hasil positif terhadap lebih dari 1 antigen. Pemeriksaan terhadap DEN-4 tidak dilakukan karena antigennya tidak tersedia.

Kelompok kontrol yaitu penderita demam bukan DBD terdiri atas 15 lelaki dan 16 perempuan dengan usia termuda 4 tahun dan tertua 35 tahun. Hasil pemeriksaan HI menunjukkan bahwa 10 pasien termasuk infeksi dengue primer dan sisanya 21 bukan infeksi dengue karena memberi hasil negatif. Dari 10 orang yang tergolong infeksi primer, 8 serum positif dengan antigen DEN-1, 7 positif dengan antigen DEN-2 dan 8 positif dengan antigen DEN-3.

Pada kelompok DBD didapatkan rerata kadar sVCAM-1 1323 ± 545 ng/mL. Nilai ini secara statistik lebih tinggi bermakna dibandingkan rerata pada kelompok demam bukan DBD 1003 ± 576 ng/mL (Tabel 1). Hasil ini tidak jauh berbeda dengan penelitian Murgue dkk. yang mendapatkan kadar sVCAM-1 pada kelompok DBD 1253 ng/mL, pada kelompok demam bukan DBD 648 ng/mL sedangkan pada kelompok kontrol sehat 453 ng/mL²¹. Di samping itu pada penelitian ini, 90% (27 dari 30) pasien dari kelompok DBD mempunyai kadar sVCAM-1 yang tinggi (>714 ng/mL) sedangkan pada kelompok demam bukan DBD kadar sVCAM-1 yang tinggi dijumpai pada 67,7% (21 dari 31) kasus. Peningkatan kadar sVCAM-1 merupakan akibat dari ekspresinya yang berlebihan karena disfungsi endotel. Ekspresi molekul adhesi dipengaruhi oleh jenis dan lamanya rangsangan baik dari mediator imun seperti sitokin maupun dari faktor virus²². Pada infeksi flavivirus termasuk virus dengue, VCAM-1 berfungsi memperkuat adhesi leukosit ke sel endotel²³. Pada penelitian Chang secara in vitro, monosit dapat mensekresi IL-1 dan TNF- α setelah 4 jam diinfeksi

virus dengue²³. Dari penelitian Shen dkk. dengan *West Nile virus*, ekspresi VCAM-1 juga dapat dipicu oleh IL-4 dan IL-13 selain oleh IL-1 dan TNF- α ²². Kadar VCAM-1 tertinggi dicapai 4 jam setelah dirangsang oleh WNV dan TNF- α ²⁴.

Pada penelitian ini kadar sVCAM-1 yang tertinggi yaitu 2764 ng/mL dijumpai pada infeksi oleh DEN-3. Menurut Murgue dkk. kadar sVCAM-1 lebih tinggi pada infeksi DEN-3 dibandingkan DEN-1 dan DEN-2²¹.

Pada penelitian ini rerata kadar vWF pada kelompok DBD 284 \pm 130%, sedang pada kelompok demam bukan DBD 327 \pm 141%. Perbedaan ini secara statistik tidak bermakna (Tabel 1).

Kadar vWF yang meningkat >150% dijumpai pada 87% penderita (26 dari 30) kelompok DBD dan pada seluruh penderita demam bukan DBD. Rerata kadar vWF lebih tinggi pada kelompok demam bukan DBD dibandingkan kelompok DBD. Mungkin hal ini karena peningkatan kadar vWF dapat terjadi melalui berbagai mekanisme.

Faktor von Willebrand yang terdapat di dalam plasma berasal dari sekresi vWF dari badan Weibel-Palade yang terdapat dalam sel endotel dan dari granula α trombosit^{24,25}. Terdapat 2 mekanisme sekresi yaitu secara *constitutive* dan secara *inducible* oleh berbagai rangsangan^{24,25}. Sekresi vWF dapat dirangsang oleh rangsangan fisik seperti shear stress, rangsang syaraf simpatik maupun keadaan hipoksemia²⁶. Pada kultur sel endotel sekresi vWF dapat dirangsang oleh epinefrin, histamin, estrogen dan fibrin²⁶. Pada penelitian Etingin dkk. endotoksin bakteri dan virus herpes simplex dapat merangsang sekresi vWF dari kultur sel endotel²⁷. Menurut Aukrust dkk. tingginya kadar vWF mempunyai korelasi yang bermakna dengan *viral load* dan TNF- α ²⁵. Sitokin pro inflamasi meningkatkan sekresi vWF dari sel endotel secara tak langsung yaitu melalui peningkatan efek rangsang trombin²⁵.

Peningkatan kadar vWF juga dapat disebabkan oleh kerusakan endotel. Hasil penelitian Kayal dkk. menunjukkan bahwa kadar vWF yang sangat tinggi pada sepsis dihubungkan dengan kerusakan endotel²⁸.

Tabel 1. Rerata kadar sVCAM-1 dan vWF pada kelompok DBD dan kelompok demam bukan DBD

	DBD	Bukan DBD	p
sVCAM-1 (ng/mL)	1323 \pm 545	1003 \pm 576	0,02
vWF (%)	284 \pm 130	327 \pm 141	0,22

Pada otopsi terhadap penderita DBD tidak ditemukan kerusakan endotel¹⁰.

Pada penelitian ini juga dicari hubungan antara parameter disfungsi endotel yaitu sVCAM-1 dan vWF dengan jumlah trombosit, kadar albumin, kadar D-dimer dan beratnya penyakit. Hasil uji korelasi menunjukkan bahwa pada pasien DBD, baik sVCAM-1 maupun vWF tidak berkorelasi dengan jumlah trombosit ($r = 0,018$ dan $r = 0,189$). Mungkin hal ini karena trombositopenia pada DBD dapat terjadi melalui beberapa mekanisme antara lain karena penghancuran trombosit oleh efek langsung virus. Di samping itu kompleks imun yang melekat pada permukaan trombosit mempermudah penghancuran trombosit oleh reticulo-endothelial system di hati dan limpa^{12,29,30}. Trombositopenia juga dapat terjadi akibat *disseminated intravascular coagulation (DIC)*^{12,29,30}.

Pada kelompok DBD kadar sVCAM-1 dan vWF juga tidak berkorelasi dengan kadar albumin ($r = 0,063$ dan $r = 0,314$). Mungkin hal ini karena selain oleh peningkatan permeabilitas vaskular akibat disfungsi endotel, hipoalbuminemia dapat disebabkan oleh berbagai keadaan seperti gangguan sintesis, kurangnya asupan protein, kehilangan melalui urin dan kehilangan melalui feces karena enteropati³¹. Albumin termasuk protein fase akut negatif karena jika terjadi inflamasi sintesisnya di hati menurun sebagai kompensasi sintesis APR lain terutama *C reactive protein*³¹. Selain karena peningkatan permeabilitas vaskular akibat disfungsi endotel, hipoalbuminemia pada DBD dapat terjadi akibat penurunan sintesis karena albumin merupakan protein fase akut negatif. Pada penelitian ini tidak ada pasien DBD yang mengalami efusi pleura.

Pada penelitian ini kadar D-dimer pada kelompok DBD berkisar antara 100 – 7400 ng/mL. Tidak ditemukan adanya korelasi antara kadar D-dimer dengan sVCAM-1 ($r = 0,159$), tetapi terdapat korelasi yang lemah antara

Tabel 2. Hubungan antara kadar sVCAM-1 dan vWF dengan jumlah trombosit, kadar albumin, D-dimer dan derajat DBD

	sVCAM-1	vWF
Jumlah trombosit	$r = 0,018$	$r = 0,189$
Kadar albumin	$r = 0,063$	$r = 0,312$
Kadar D-dimer	$r = 0,159$	$r = 0,472$
Derajat DBD	$r = 0,143$	$r = - 0,450$

D-dimer dengan vWF ($r = 0,472$ dan $p = 0,008$). D-dimer merupakan petanda aktivasi koagulasi dan fibrinolisis. Makin tinggi aktivasi koagulasi dan fibrinolisis makin tinggi kadar D-dimer. Makin tinggi aktivasi koagulasi, maka makin banyak trombin yang terbentuk. Telah diketahui bahwa trombin dapat merangsang sekresi vWF. Jadi makin tinggi aktivasi koagulasi makin banyak vWF disekresikan ke plasma.

Pada penelitian ini ada beberapa pasien DBD yang tidak menunjukkan peningkatan kadar D-dimer. Mungkin hal ini karena pada disfungsi endotel juga dilepaskan plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) yang menghambat proses fibrinolisis sehingga D dimer tidak meningkat^{13,14}. Kemungkinan lain pada penderita DBD berat, kadar fibrinogen sangat rendah akibat konsumsi sehingga fibrin yang terbentuk relatif sedikit dan D-dimer yang dihasilkan tidak banyak.

Pada penelitian ini juga dicari korelasi antara kadar sVCAM-1 dan vWF dengan beratnya penyakit. Hasilnya seperti terlihat pada Tabel 2 menunjukkan bahwa kadar sVCAM-1 tidak berkorelasi dengan jumlah trombosit, kadar albumin, kadar D-dimer maupun beratnya penyakit, tetapi terdapat korelasi negatif yang lemah antara vWF dengan beratnya penyakit ($r = -0,450$ dan $p = 0,013$). Jadi pada derajat penyakit yang lebih berat, rerata kadar vWF lebih rendah tetapi pada penelitian ini hanya ada 2 pasien tergolong derajat III dan 1 pasien derajat IV. Hal ini belum bisa dijelaskan mekanismenya. Kemungkinan hal ini terjadi akibat konsumsi yang berlebihan atau sel endotel dan trombosit sudah *exhausted* sehingga walaupun dirangsang sekresi vWF tidak meningkat.

4. Kesimpulan

Dari hasil penelitian ini disimpulkan bahwa pada DBD maupun demam bukan DBD terjadi disfungsi endotel yang diperlihatkan dengan kadar sVCAM-1 dan vWF yang tinggi. Namun tidak terdapat korelasi antara sVCAM-1 dengan jumlah trombosit, kadar albumin, kadar D-dimer maupun beratnya penyakit. Hanya ada korelasi yang lemah antara kadar vWF dengan kadar D-dimer dan beratnya penyakit, sedangkan dengan parameter lain tidak ada korelasi.

Ucapan Terima Kasih

Ucapan terima kasih disampaikan kepada direktur rumah sakit, Kepala Bagian Ilmu Kesehatan Anak dan Kepala Bagian Ilmu Penyakit Dalam dari RS. Persahabatan dan RS. Budhi Asih yang telah memberi ijin untuk melakukan penelitian pada pasien DBD dan demam bukan DBD di rumah sakit tersebut.

Daftar Acuan

1. Suroso T, Hadinegoro SR, Wuryadi S, Simanjuntak G, Umar AI, Pitoyo PD, dkk. Pencegahan dan Penanggulangan Penyakit Demam Dengue dan Demam Berdarah Dengue. Jakarta: WHO dan Departemen Kesehatan RI, 2000.
2. Halstead SB. Dengue Haemorrhagic Fever a Public Health Problem and a Field of Research. *Bull WHO* 1980; 58: 1-21.
3. Suharti C. *Dengue Hemorrhagic Fever in Indonesia: The Role of Cytokines in Plasma Leakage, Coagulation and Fibrinolysis*. PhD Thesis. Nijmegen Universiteit, The Netherland, 2001.
4. Monath TP, Heinz FX, Flavivirus. In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM. editors, *Fields Virology*. 3rd ed. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1996; 961-1022.
5. Graham RR, Juffrie M, Tan R, Hayes CG, Laksono I, Ma'roef C, Erlin, Sutaryo, Porter KR, Halstead SB. A Prospective Seroepidemiology Study on Dengue in Children Four to Nine Years of Age in Yogyakarta Indonesia: Studies in 1995-1996. *Am J Trop Med Hyg* 1999; 61: 412-419.
6. Nimmannitya S. Dengue Hemorrhagic Fever: Disorder of Hemostasis. In: Jootar S, Lee SH, McArthur JR, Ungkanont A. editors, Bangkok: ISH-APD, 1999: 184-187.
7. Wuryanto S. Diagnosis Laboratorium Infeksi Virus Dengue. Dalam: Hadinegoro SR, Satari HI. editor, *Demam Berdarah Dengue Naskah Lengkap Pelatihan bagi Pelatih Dokter Spesialis Anak & Dokter Spesialis Penyakit Dalam Tatalaksana Kasus DBD*. Jakarta: Balai Penerbit FKUI; 1999: 55-64.
8. Soemarmo SP. *Demam Berdarah Dengue pada Anak*. Jakarta: Penerbit Universitas Indonesia, 1988.
9. Hathirat P, Isarangkura P, Srichaikul T, Suvatte V, Mitrakul C. Abnormal Hemostasis in Dengue Hemorrhagic Fever. *Southeast. Asian J Trop Med Public Health* 1993; 24: 80-85.
10. Anderson R, Wang S, Osiowy C, Issekutz A. Activation of Endothelial Cells via Antibody Enhanced Dengue Virus Infection of Peripheral Blood Monocytes. *J Virol* 1997; 71: 4226-4232.
11. Whalen MJ, Doughty LA, Carlos TM, Wisniewski SR, Kochanek PM, Carcillo JA. Intercellular Adhesion Molecule-1 and Vascular Cell Adhesion Molecule-1 are Increased in Plasma of Children with Sepsis-induced Multiple Organ Failure. *Crit Care Med* 2000; 28: 2600-2607.
12. Hadinegoro SR. *Telaah Endotoksemia pada Perjalanan Penyakit Demam Berdarah Dengue : Perhatian Khusus Pada Syok, Produksi TNF- α , dan Interleukin-6 sebagai Factor Predictor Demam*

- Berdarah Dengue Berat*. Disertasi. Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, Indonesia, 1996.
13. Cines DB, Pollak ES, Buck CA, Loscalzo J, Zimmerman GA, McEver RP, et al. Endothelial Cells in Physiology and in The Pathophysiology of Vascular Disorders. *Blood* 1998; 9: 3527–3561.
 14. Holvoet P, Collen D. Thrombosis and Atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol* 1997; 8: 320-328.
 15. Anonymous. Prevention and Control of Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever. Comprehensive Guidelines. New Delhi: WHO Regional, 1999.
 16. Anonymous Leaflet Albumin. Boehringer Mannheim 1993.
 17. Anonymous. Leaflet Human sVCAM-1 Immunoassay. R&D System.
 18. Anonymous. Leaflet VIDAS vWF. BioMerieux
 19. Anonymous. Leaflet D-dimer. NycoCard.
 20. Muchlastriningsih E, Susilowati S, Hutaaruk DS, Saragih JM. Analisis Hasil Tes Hemaglutinasi Penderita Demam Berdarah Dengue di Jakarta, *Cermin Dunia Kedokteran* 1992; 119: 5-8.
 21. Murgue B, Sassar O, Deparis X. Plasma Concentration of sVCAM-1 in Dengue Patients: Association with Disease Severity and Epidemic Patterns. *Am J Trop Med Hyg* 1999; S-61: 212.
 22. Shen J, T-To SS, Schrieber L, King NJC. Early E-selectin, VCAM-1, ICAM-1, and Late Major Histocompatibility Complex Antigen Induction on Human Endothelial Cells by Flavivirus and Comodulation of Adhesion Molecule Expression by Immune Cytokines. *J Virol* 1997; 71: 9323-9332.
 23. Chang DM, Shaio MF. Production of Interleukin-1 (IL-1) and IL-1 Inhibitor by Human Monocytes Exposed to Dengue Virus. *J Infect Dis* 1994; 170: 811-817.
 24. Van Mourik JA, de Witt TR. Von Willebrand Factor Propeptide in Vascular Disorders. *Thromb Haemost* 2001; 86: 164-171.
 25. Aukrust P, Bjomsen S, Lunden B, Otterdal K, Ng EC, Ameln W, Ueland T, Muller F, Solum NO, Brosstad F, Froland SS. Persistently Elevated Levels of von Willebrand Factor Antigen in HIV Infection: Down Regulation During Highly Active Antiretroviral Therapy. *Thromb Haemost* 2000; 84: 183-187.
 26. Veyradier A, Jenkins CS, Fressinaud E, Meyer D. Acquired von Willebrand Syndrome: From Pathophysiology to Management. *Thromb Haemost* 2000; 84: 175-182.
 27. Etingin OR, Silverstein RL, Hajjar DP. Von Willebrand Factor Mediates Platelet Adhesion to Virally Infected Endothelial Cells. *Proc Natl Acad Sci* 1993; 90: 5153-5156.
 28. Hober D, Poli L, Roblin B, Gestas P, Chungue E, Granic G, et al. Serum Level of Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α), Interleukin-6 (IL-6), and Interleukin1 β (IL-1 β) in Dengue Infected Patients. *Am J Trop Med Hyg* 1993; 48: 324-331.
 29. Krishnamurti C, Kalayanarooj S, Cutting MA, Peat RA, Rothwell SW, Reid TJ, Green S, Nisalak A, Endy TP, Vaughn DW, Nimmannitya S, Innis B. Mechanism of Hemorrhage in Dengue without Circulatory Collapse. *Am J Trop Med Hyg* 2001; 65: 840-847.
 30. Funahara Y, Ogawa K, Fujita N, Okuno Y. Three Possible Triggers to Induce Thrombocytopenia in Dengue Virus Infection. *Southeast Asian J Trop Med Pub Health* 1987; 18: 346-350.
 31. Silverman LM, Christenson RH. Amino Acid and Proteins. In: Burtis CA, Ashwood ER. editors, *Tietz Textbook of Clinical Chemistry*. 2nd ed. Philadelphia: WB Saunders Co: 1994: 702-704.