

## **Biomarker Sepsis Bakterial**

Danny Luhulima

Departemen Patologi Klinik

Fakultas Kedokteran Universitas Kristen Indonesia

### **ABSTRAK**

Sepsis merupakan masalah kegawatdaruratan medik yang serius sehingga memerlukan penanganan cepat dan tepat. Sepsis adalah infeksi yang disertai inflamasi sistemik. Kultur merupakan standar baku emas, namun membutuhkan waktu lama, sehingga dibutuhkan biomarker sepsis yang cepat dan tepat. Biomarker diagnosis sepsis yang ideal adalah sangat spesifik dan sensitif, mudah penggunaannya, cepat dan murah serta berbanding lurus dengan kegawatan. Saat ini *C- reactive protein* dan *procalcitonin*, neutrophil – limfosit (NLCR / *Neutrophil Lymphocyte Count Ratio*), eosinopenia, I/T rasio dan *Monocyte Distribution Width* juga dapat digunakan sebagai biomarker sepsis. Pada tinjauan pustaka ini, penulis mencoba membahas beberapa biomarker sepsis yang sering digunakan.

*Kata Kunci: Sepsis, biomarker, bakterial*

## **Biomarker Sepsis by Bacteria**

Danny Luhulima

Department of Clinical Pathology

Medical Faculty Universitas Kristen Indonesia, Jakarta

### **ABSTRACT**

Sepsis is a matter of very serious medical emergency and requires prompt and proper handling. Sepsis is a condition of systemic inflammation with infection. Culture is the gold standard but the problem takes a long time to do, that is, clinicians need precise and accurate sepsis markers. The best of marker of sepsis are: high sensitivity and specificity, easy to use, chipper and quick result, directly proportional to severity. Various parameters such as C-reactive protein, procalcitonin, eosinopenia, level neutrophil and reduction of lymphocyte count, I/T ratio and monocyte distribution width (MDW) are used as a marker of sepsis due to bacterial infection. In this literature review, the author tries to discuss some of the sepsis markers that are often used.

*Keywords: sepsis, marker, bacteria*

## **PENDAHULUAN**

Sepsis masih merupakan masalah di dunia kesehatan dan sering menyebabkan kematian karena sering terlambat diagnosis dan berakibat kematian, sehingga perlu ada biomarker sepsis yang mampu mendeteksi sepsis sedini mungkin.

*Central Disease Control* (CDC) di Amerika melaporkan insiden sepsis meningkat dari 73,6 per 100.000 pasien pada tahun 1979 menjadi 175,9 per 100.000 pasien pada tahun 1987 (Aryana, 2006). Tahun 2007 insiden sepsis menurun menjadi 50 hingga 95 kasus/100.000 penduduk, namun diprediksi akan meningkat sekitar 9% per tahun. Angka mortalitas dari sepsis berkisar 30 hingga 70 % (Aryana, 2006) (Kresno, 2009). Rerata biaya yang dibutuhkan berkisar US\$ 22.000/kasus. Di Indonesia mortalitas lebih tinggi, yaitu 56,83% (Yogyakarta), 54,17% (Palembang), bahkan pada tahun 2004 di Solo didapatkan 83,1% penderita sepsis meninggal (Budianto, 2006). Berdasarkan data di bagian rekam medik RSUD Dr Soetomo Surabaya tahun 2009, didapatkan 1460 penderita sepsis yang dirawat pada ruang rawat inap penyakit dalam RSUD Dr Soetomo. Dari data diatas membuktikan bahwa sepsis masih merupakan masalah di seluruh dunia (Luhulima, 2012).

Jika masalah diagnosis dini sepsis dapat diatasi, diharapkan dapat mengurangi resiko kematian penderita sepsis. Biomarker diagnosis sepsis yang ideal adalah: a. sangat spesifik dan sensitif, b. mudah penggunaannya, c. cepat dan murah, d. berbanding lurus dengan kegawatan. Kultur merupakan baku emas, namun membutuhkan waktu lama.

Saat ini telah ada beberapa biomarker sepsis yang mendekati ideal seperti procalcitonin dan *C-Reactive Protein*, namun sering menjadi kendala terutama di negara berkembang karena biaya pemeriksaan yang tinggi. Beberapa biomarker seperti eosinopenia, *neutrophil to lymphocyte*

*count ratio*, I/T ratio dan *monocyte distribution width* juga dapat diandalkan sebagai biomarker sepsis bakteri.

## **SYSTEMIC INFLAMMATORY RESPONSES SYNDROME DAN SEPSIS**

Beberapa istilah yang harus dipahami sehubungan dengan sepsis antara lain infeksi, bakteremia, SIRS, sepsis, sepsis berat, syok sepsis, dan *Multiorgan Dysfunction Syndrome*. *Systemic inflammatory responses syndrome* merupakan kumpulan gejala yang dapat disebabkan oleh iskemia, proses inflamasi, trauma, infeksi atau gabungan dari beberapa keadaan di atas. Infeksi adalah respon inflamasi akibat adanya mikroorganisme atau invasi mikroorganisme ke jaringan. Bakteremia adalah ditemukannya bakteri pada darah. (Burdette, 2010).

Sepsis berdasarkan *American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Consensus* tahun 1992 didefinisikan sebagai suatu infeksi yang melibatkan dua atau lebih manifestasi SIRS: (1) suhu tubuh lebih dari 38<sup>0</sup>C atau kurang dari 36<sup>0</sup>C, (2) frekuensi nadi lebih dari 90 kali dalam satu menit, (3) frekuensi pernapasan lebih dari 20 kali dalam satu menit atau PCO<sub>2</sub> kurang dari 32 mmHg, (4) jumlah lekosit lebih dari 12.000 sel/uL atau kurang dari 4000 sel/uL atau lebih dari 10% *immature (band) forms*.

Perlu juga diketahui bahwa untuk menentukan kriteria SIRS, klinisi harus memperhatikan keadaan penderita sebagai berikut:

- a) usia yang cukup ekstrim (sangat muda atau sangat tua) memungkinkan SIRS tidak bermanifestasi seperti kriteria SIRS diatas, sehingga perlu perhatian khusus, misal pada bayi yang baru lahir akan memiliki frekuensi nadi lebih dari 100 kali per menit. Pada orang yang usia lanjut cenderung memiliki gangguan pernapasan sehingga frekuensi napas dapat menjadi lebih cepat atau melambat,

- b) penderita yang sedang mengonsumsi obat golongan *beta-blocker* atau *calcium channel blocker* yang dapat menurunkan frekuensi nadi sehingga bisa tidak meningkat, demikian juga adrenalin dan steroid yang akan meningkatkan nadi,
- c) tekanan darah tidak termasuk dalam kriteria SIRS, namun hal ini tetap merupakan biomarker yang penting. Pada hipotensi, penetapan akses pembuluh darah dan resusitasi cairan menjadi penting, namun hubungan antara hipotensi dan SIRS tidak selalu berkorelasi kecuali pada keadaan sepsis,
- d) frekuensi napas yang rendah dapat merupakan suatu tanda kegawatan penderita (Burdette, 2010).

Sepsis berat adalah sepsis yang disertai dengan disfungsi organ, hipoperfusi, atau hipotensi dan kadang disertai laktoasidosis, oliguri dan penurunan kesadaran. *Sepsis-induced hypotension* adalah ditemukannya tekanan darah sistolik kurang dari 90 mmHg atau penurunan lebih dari 40 mmHg dari awal tanpa ditemukan penyebab lain hipotensi. Syok sepsis adalah bagian dari sepsis berat yang disertai dengan hipotensi yang menetap dan gangguan perfusi jaringan meskipun telah dilakukan resusitasi cairan yang adekuat. MODS adalah sepsis yang disertai dengan adanya gangguan fungsi organ akibat homeostasis yang tidak bisa dipertahankan (Aryana, 2006) (Burdette, 2010).

Patofisiologi SIRS meskipun banyak macamnya bergantung penyebabnya. Inflamasi adalah respon tubuh yang non spesifik terhadap kimia, trauma, atau infeksi. SIRS ditandai dengan adanya hipersitokinemia (Aryana, 2006).

Proses inflamasi merupakan suatu proses kompleks yang melibatkan respon imunologis humoral dan seluler, komplemen dan sitokin (Burdette, 2010). Pada SIRS terjadi patogenesis yang sangat kompleks, melibatkan banyak sel, dan merangsang sekresi berbagai hormon.

Hubungan interaksi respon tubuh dengan SIRS dapat dibagi atas tiga tahap (Burdette, 2010) :

- 1) Pada awal proses, sitokin lokal akan diproduksi sebagai respon terhadap inflamasi, sehingga diharapkan dapat memperbaiki kerusakan dan mengaktifkan *reticular endothelial system*.
- 2) Sejumlah kecil sitokin lokal dilepaskan ke dalam sirkulasi untuk meningkatkan respon lokal. Keadaan ini menyebabkan stimulasi *growth factor* dan melibatkan makrofag dan trombosit. Respon fase akut ini biasanya dipengaruhi oleh penurunan mediator proinflamasi dan pelepasan antagonis endogen, tujuannya adalah homeostasis.
- 3) Jika proses homeostasis tidak berjalan dengan baik, maka akan terjadi reaksi sistemik. Pada keadaan ini sitokin yang dihasilkan akan bersifat destruktif dan tidak bersifat proteksi lagi. Konsekuensi yang terjadi pada keadaan ini adalah aktivasi jalur humoral, aktivasi RES dan mengakibatkan penurunan sirkulasi darah. Hal ini menyebabkan disfungsi organ tubuh.

Pada patofisiologi sepsis, sistem kekebalan alami adalah pertahanan lini pertama tubuh terhadap infeksi yang diaktifkan bila ada mikroorganisme patogen masuk melewati pertahanan fisik, mekanik dan kimiawi tubuh. Sistem kekebalan alami bisa berupa seluler yang terdiri dari sel monosit, makrofag, neutrofil, eosinofil, sel *Natural Killer* dan humoral berupa protein terlarut seperti komplemen, *C Reactive Protein* dan sitokin.

Sistem kekebalan yang didapat akan membantu sistem kekebalan alami melalui aktivitas sel limfosit. Limfosit T bersifat seluler dan limfosit B bersifat humoral. Sistem imun akan diaktifkan oleh protein patogen yang dapat berasal dari berbagai jenis mikroorganisme, misalnya endotoksin (*lipopolysaccharide*), *peptidoglycan*, *lipoechoic acid*, *lipopeptide*, *flagelin*, *mannan*

dan virus RNA. Kegagalan sistem imun mengatasi infeksi dan menimbulkan reaksi imun yang tidak sesuai, dan dikatakan sebagai sepsis (Aryana 2006) (Kresno, 2009).

Sitokin adalah elemen kunci pada patofisiologi sepsis. Sitokin yang dihasilkan oleh sel yang mengalami injuri bersifat sebagai *peptide immunoregulator* yang polimorfik. Sitokin *Tumor Necrosing Factor- $\alpha$* , interleukin IL-1 dan IL-8 sebagai sitokin proinflamasi dan IL-6, IL-10 sebagai sitokin anti inflamasi (Aryana, 2006) (Kresno, 2009). TNF- $\alpha$  dan IL-1 telah terbukti akan dilepas dalam jumlah besar dalam waktu satu jam setelah terjadinya proses SIRS dan memiliki efek lokal dan sistemik. Dalam penelitian *in vitro* menunjukkan bahwa kedua sitokin ini diberikan secara tersendiri tidak menghasilkan respon hemodinamik signifikan, namun akan menyebabkan cedera paru yang parah dan hipotensi bila diberikan bersamaan. TNF- $\alpha$  dan IL-1 bertanggung jawab terhadap demam dan pelepasan hormon stres (norepinephrine, vasopresin, aktivasi sistem *renin-angiotensin-aldosteron*) (Burdette, 2010).

Sitokin lain, terutama IL-6, merangsang pelepasan reaktan fase akut seperti CRP dan PCT. Infeksi juga terbukti menghasilkan TNF- $\alpha$  lebih banyak daripada trauma dan meningkatkan pelepasan IL-6 dan IL-8. Hal ini menjelaskan mengapa pada infeksi dapat mengakibatkan demam lebih tinggi dibandingkan trauma (Burdette, 2010).

Toksin mikroba akan merangsang produksi TNF- $\alpha$  dan IL-1 menyebabkan adesi leukosit pada endotel dan mensekresi protease (bahan pengganti alat tubuh yang rusak) dan metabolit arakidonat. Hal ini akan mengaktifasi sistem hemostasis. Ada beberapa faktor yang berperan pada proses ini, yaitu: respon tubuh, peranan sel endotel, monosit, aktivasi sistem inflamasi dan koagulasi. Hal ini berperan dalam menentukan prognosis pasien sepsis. Inflamasi dan koagulasi merupakan dua keadaan yang akan saling berpengaruh untuk menentukan prognosis pasien

yang mengalami infeksi. Pada SIRS terjadi reaksi sitokin proinflamasi sehingga sitokin akan meningkat (hipersitokinemia) (Aryana, 2006).

Saat ini muncul teori baru tentang sepsis karena dari penelitian terdahulu terbukti bahwa peran reaksi proinflamasi tidak dominan sehingga pada konsep baru sepsis ditambahkan dua istilah baru yaitu *Compensatory Anti Inflammatory Responses* dan *Mixed Proinflammatory and Antiinflammatory Responses*.

Pada konsep baru dijelaskan ada lima tahapan terjadinya MODS pada sepsis:

- 1) stadium reaksi lokal,
- 2) stadium respon sistemik awal,
- 3) stadium inflamasi sistemik massif,
- 4) stadium imunosupresif massif,
- 5) stadium *immune dissonance*.

Penjelasan konsep baru yang menyebabkan MODS adalah sebagai berikut:

#### 1. Stadium reaksi lokal

Respon awal tubuh adalah menginduksi mediator proinflamasi untuk menghancurkan jaringan yang rusak, benda asing, bakteri dan merangsang pertumbuhan jaringan baru. Kompensasi mediator anti inflamasi segera muncul untuk mencegah agar proinflamasi tidak terlalu destruktif. IL-4, IL-10, IL-11, IL-13, reseptor TNF- $\alpha$  terlarut, antagonis reseptor IL-1, *tumor growth factor* dan mediator lainnya bertujuan mengurangi ekspresi *Major Histocompatibility Complex* kelas II, menurunkan aktivitas *Antigen Presenting Cell*, dan menurunkan aktivitas sel untuk memproduksi sitokin inflamasi. Semua reaksi ini berlangsung lokal tanpa reaksi sistemik berlebihan.

#### 2. Stadium respon sistemik awal

Bila mediator proinflamasi sudah berada di sirkulasi maka keadaan ini menandakan kerusakan jaringan dan bakteri yang ada tidak dapat dikontrol oleh reaksi lokal saja. Mediator proinflamasi akan membantu neutrofil, sel limfosit T, dan B, trombosit dan faktor koagulasi menuju kearah lokasi injuri atau infeksi. Reaksi ini akan merangsang respon kompensasi sistemik anti inflamasi, sehingga terjadi respon tubuh untuk menurunkan sistemik proinflamasi. Manifestasi klinis yang terjadi biasanya tidak berat dan jarang menimbulkan disfungsi organ,

### 3. stadium inflamasi sistemik massif

Pada stadium ini terjadi kehilangan mekanisme regulasi respon proinflamasi sehingga timbul manifestasi klinis SIRS. Hal ini terjadi akibat dari:

- a) progresivitas disfungsi endotel sehingga terjadi peningkatan permeabilitas mikropiler,
- b) trombosit akan memblok mikrosirkulasi sehingga timbul iskemia atau injuri reperfusi dan menginduksi *Heat Shock Protein*,
- c) aktivasi sistem koagulasi dan gangguan jalur inhibisi protein C dan protein S,
- d) adanya vasodilatasi dan gangguan distribusi aliran darah sehingga pasien jatuh pada fase syok. Pada stadium ini merupakan ancaman terjadinya disfungsi organ dan *multiple organ failure* bila homeostasis tidak segera diatasi.

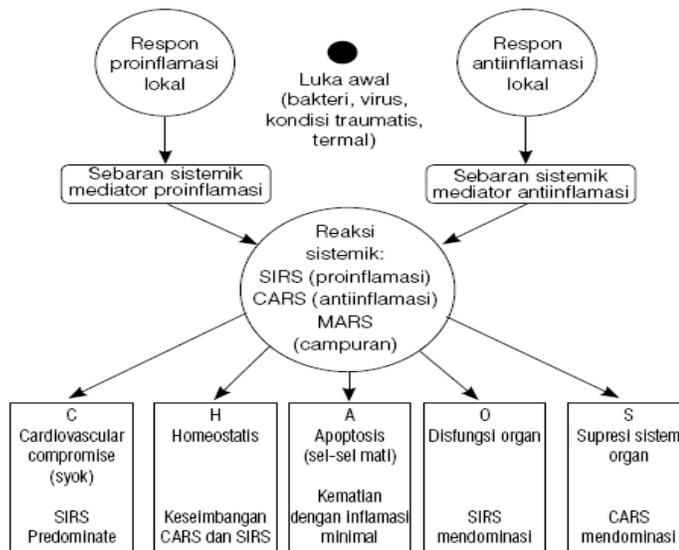
### 4. stadium immunosupresi massif

Reaksi antiinflamasi tidak efektif lagi dan menyebabkan terjadinya immunodefisiensi (*immune paralysis* atau CARS). Pada CARS didapatkan ekspresi *human leucocyte*

*antigen* HLA DR menurun kurang dari 30%. Menurunnya HLA-DR akan membuat kondisi penderita bertambah buruk.

5. stadium imunologi *dissonance*

merupakan stadium akhir dari sepsis. Pada stadium ini terjadi ketidaksesuaian sistem imunomodulator dan biasanya akan statis dan menyebabkan kematian.



Gambar 1, Konsep Baru Sepsis

Sepsis yang didefinisikan sebagai respon inflamasi sistemik ternyata tidak sepenuhnya menjadi respon inflamasi. Penelitian lain mendapatkan bahwa ternyata sepsis adalah suatu kondisi immunosupresif. Hal ini didasari oleh didapatkannya bukti bahwa pada sepsis terjadi kehilangan kemampuan pada reaksi hipersensitivitas tipe lambat dan kemampuan eliminasi infeksi (Aryana, 2006).

## **BIOMARKER SEPSIS BAKTERIA**

Pada makalah ini penulis menguraikan beberapa biomarker sepsis yang mendekati ideal seperti procalcitonin dan *C-Reactive Protein*, eosinopenia, *neutrophil to lymphocyte count ratio*, I/T ratio dan *Monocyte distribution width*.

### **C-REACTIVE PROTEIN**

*C-Reactive Protein* merupakan suatu protein fase akut yang terdiri 5 – 6 subunit polipeptida yang *non glycosylated* dan 206 residu asam amino yang berikatan secara kovalen membentuk suatu cakram dengan berat molekul 110 – 140 kDa. CRP terdapat pada serum normal dalam jumlah yang sangat sedikit yang disintesis di hati oleh sel hepatosit dan kadarnya akan meningkat dengan cepat setelah 6 - 8 jam terjadinya kerusakan jaringan serta mencapai puncaknya setelah 24 jam, kemudian akan menurun dengan cepat bila kerusakan jaringan telah mereda.

Dalam keadaan tertentu, kadar CRP dapat meningkat sampai 100 kali lipat akibat penyakit infeksi maupun non infeksi. Asupan tinggi kolesterol juga berkaitan dengan peningkatan kadar CRP. Peningkatan CRP terjadi apabila terdapat kerusakan jaringan baik akibat infeksi maupun bukan infeksi dipengaruhi oleh mediator yaitu IL 6, TNF- $\alpha$  dan TGF, sehingga dapat dijadikan sarana penunjang untuk menilai adanya kerusakan jaringan yang terjadi baik yang bersifat kronis maupun yang bersifat akut (kawthalkar, 2010).

Fungsi CRP dalam tubuh belum diketahui dengan pasti, namun diduga memiliki beberapa fungsi diantaranya:

1. Mengikat C-Polisakarida bakteri dengan reaksi presipitasi dan aglutinasi.
2. Meningkatkan aktifitas dan motilitas sel fagosit (granulosit dan monosit)
3. Mengaktifkan komplemen melalui jalur klasik (C1q) maupun jalur alternatif
4. Menghambat agregasi trombosit.

5. Mengikat limfosit T.
6. Menetralkan toksin yang terbentuk akibat kerusakan jaringan.

Pemeriksaan kadar CRP merupakan pemeriksaan yang sering diminta oleh para klinisi dengan tujuan untuk:

1. Membantu menegakkan diagnosis pada penyakit yang menyebabkan peradangan dan kerusakan jaringan
2. Membantu memantau pengobatan penyakit kerusakan jaringan yang dilakukan oleh klinisi.
3. Meramalkan kemungkinan adanya serangan penyakit jantung koroner. (Nicola R) (kawthalkar, 2010)

*C - Reactive Protein* memiliki kelemahan dalam membedakan inflamasi dan infeksi. Beberapa penelitian menunjukkan bahwa CRP memiliki sensitivitas yang sedang dalam membedakan infeksi dan inflamasi umumnya. Oleh karena itu sebaiknya CRP tidak digunakan secara tersendiri sebagai biomarker infeksi.

## **EOSINOPENIA**

Estimasi jumlah eosinofil di sirkulasi adalah satu hingga tiga persen dari jumlah leukosit atau jumlah absolutnya kurang dari 350 sel/uL (Abidi et al, 2008) (Shaaban et al, 2010). Masa hidup eosinofil di sirkulasi berkisar delapan jam hingga tujuh hari, kemudian bermigrasi ke jaringan dan akan menetap disana selama beberapa minggu.

Sifat dan pengaruh eosinofil antara lain:

- a) membunuh parasit, karena granula eosinofil mengandung *Major Basic Protein* (MBP) yang bersifat toksik terhadap parasit,

- b) Sitoplasma eosinophil mengandung *large bright red-orange granules*. Granul eosinofil ini mengandung *acid hydrolase, histaminase, aryl-sulphatase B* yang dapat mengaktivasi *slow - reacting substance* dari basophil dan sel mast, serta *phospholipase D* yang mengaktivasi *platelet activating factors*,
- c) menetralsir heparin yang dikeluarkan oleh sel mast.

Pelepasan eosinofil dari sumsum tulang dapat dihambat oleh steroid. Eosinopenia adalah jumlah eosinofil di bawah jumlah normal dan sudah dikemukakan oleh Zappert et al (1893) sebagai akibat dari respon inflamasi terhadap suatu infeksi akut dan telah dibuktikan kegunaannya oleh Schilling (1929) sebagai biomarker infeksi akut oleh bakteri ( Gil et al, 2003) (Shaaban et al, 2010).

Eosinopenia dan neutrophilia adalah merupakan hal yang khas timbul akibat respon terhadap stress akut atau infeksi akut. Mekanisme ini belum dipahami secara baik, diduga keadaan eosinopenia pada infeksi akut atau stress akut melibatkan *adrenal glucocorticosteroids* dan *epinephrine*, namun teori ini masih belum dapat menjelaskan mengapa terjadi eosinopenia pada keadaan infeksi akut atau stress akut (Bass, 1980).

Teori yang mungkin mendukung terjadinya eosinopenia pada infeksi akut atau stress akut adalah sebagai berikut:

- a) menghilangnya atau menurunnya jumlah eosinofil dari sirkulasi adalah akibat terlokalisir di jaringan tubuh lainnya seperti di lokasi inflamasi, kelenjar limfe, limpa dengan cara *diffuse intravascular margination*, atau karena terjadi destruksi eosinofil,
- b) terjadi supresi pelepasan eosinofil matur dari sumsum tulang,
- c) terjadi supresi produksi eosinofil.

Bass et al (1979) melakukan penelitian tentang eosinopenia. Pada hewan coba tikus dilakukan inokulasi kuman seperti *Pneumococcus*, *Staphylococcus aureus*, *Coxsackie B4 virus*, setelah itu dilakukan pemeriksaan jumlah eosinofil di darah perifer, sumsum tulang, biopsi di daerah abses akibat infeksi *Staphylococcus aureus*, dan splenektomi. Hasil penelitiannya: pada peradangan akut atau infeksi akut didapatkan jumlah eosinofil yang rendah di sumsum tulang yang diduga akibat hambatan stimulus produksi eosinophil. Ia juga melakukan biopsi abses akibat infeksi *Staphylococcus* dengan hasil meningkatnya eosinofil disekitar inflamasi. Hal ini dapat menerangkan mengapa eosinofil menurun di sirkulasi pada infeksi akut.

Pada tahun 1980, Bass et al kembali juga melakukan penelitian eosinopenia pada hewan coba kelinci dan menyimpulkan hilangnya eosinofil dari sirkulasi dan bermigrasi ke lokasi inflamasi dimediasi oleh sitokin dan *chemo tactic substances* lain (C5a dan *fibrin fragments*) yang dilepas ke sirkulasi selama proses inflamasi akut terjadi. Fibrin(ogen) telah terbukti menyebabkan terjadinya respon inflamasi. Pada keadaan ini sitokin pro-inflamasi meningkat (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  dan IL-6). Peningkatan C5a juga merangsang sintesis dan pelepasan sitokin pro-inflamasi seperti TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8 (Guo, 2006).

Pelepasan eosinofil dari sumsum tulang juga dihambat oleh peningkatan hormon glukokortikosteroid (Bass, 1980) (Hilman 2005) (Aryana, 2006). Penyuntikan histamin dosis tinggi pada kuda dan anjing juga terbukti menghasilkan eosinopenia (Bass 1980).

Peningkatan jumlah netrofil pada sepsis ternyata juga berdampak buruk pada penderita karena netrofil yang sebelumnya diduga sebagai suatu mekanisme untuk mengeradikasi kuman patogen ternyata juga dapat mengakibatkan kerusakan jaringan yang lebih luas karena peningkatan produksi oksidan yang berlebihan dan terjadi peningkatan mediator proinflamasi seperti TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6 dan keadaan ini juga akan membuat eosinofil semakin menurun (Aryana 2006).

Gil et al (2003) meneliti eosinopenia dan menyimpulkan bahwa pada inflamasi akibat infeksi bakteri jumlah eosinofil kurang dari 40 sel/uL. Abidi et al (2008) adalah yang pertama kali meneliti dan menyimpulkan bahwa eosinopenia dapat digunakan sebagai biomarker sepsis pada penderita baru di ICU dengan sensitivitas 80 % dan spesifisitas 91 %, namun tidak dapat digunakan sebagai nilai prognostik karena tidak ada perbedaan bermakna pada kadar eosinopenia pada penderita sepsis, sepsis berat dan syok sepsis.

Shaaban et al, (2010) juga meneliti penderita sepsis dan menilai eosinopenia, hasil penelitian ini disimpulkan bahwa eosinopenia memiliki sensitivitas 81 % dan spesifisitas 65 % sehingga mereka menganggap eosinopenia kurang baik jika digunakan sebagai biomarker sepsis pada penderita baru di ICU.

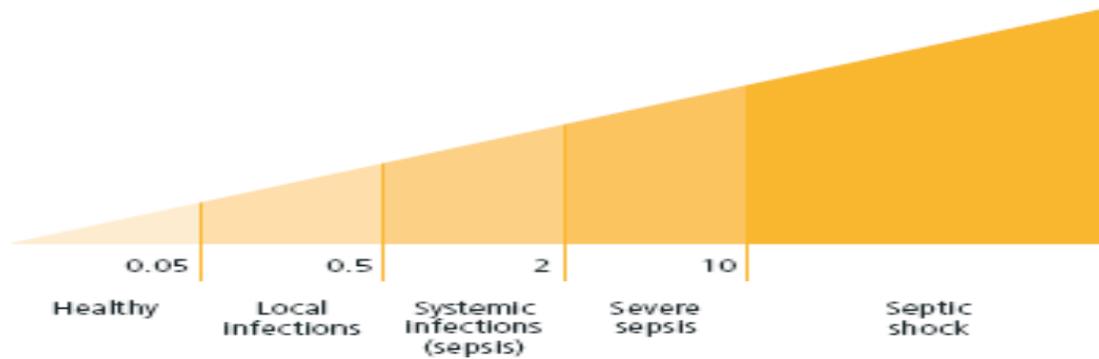
Penelitian di Surabaya ditemukan bahwa eosinopenia dapat diandalkan untuk diagnosis sepsis dengan sensitivitas 80% dan spesifisitas 75% dengan nilai *cut off* eosinophil kurang dari 50/uL (Luhulima D, 2012).

Van Heel et al (Belgia, 2008) membandingkan jumlah eosinofil pada 11 penderita anak dengan diagnosis sepsis dan penderita menjalani operasi dan tidak menderita infeksi yang dirawat di *Perinatology Intensive Care Unit*. Hasilnya disimpulkan bahwa eosinopenia sebanding dengan nilai CRP yang tinggi pada penderita sepsis.

## **PROCALCITONIN**

Beberapa penelitian menunjukkan procalcitonin memiliki sensitivitas dan spesifisitas tinggi terhadap infeksi dan sepsis. Procalcitonin pertama kali dikenali dari sel karsinoma medula tiroid (Buchori 2006).

Dari gambar dua kita lihat bahwa nilai PCT pada orang sehat kurang dari 0,05 ng/uL, infeksi lokal 0,05 sampai 0,5 ng/uL, sepsis lebih dari 0,5 sampai dua ng/uL, sepsis berat 2,1 sampai 10 ng/uL dan syok sepsis kadar PCT lebih dari 10 ng/uL. (*Brahms PCT*)



Gambar 2, Nilai Procalcitonin pada sepsis (*Brahms PCT*)

Leclerc (2002) mengemukakan bahwa *cut off* PCT pada orang normal, inflamasi akibat infeksi virus, penyakit autoimun, inflamasi kronik, infeksi lokal adalah kurang dari 0,5 ng/mL, sedangkan kadar 0,5 sampai 2 ng/mL didapatkan pada penderita SIRS. Untuk sepsis adalah lebih dari 2,0 ng/mL.

Procalcitonin akan meningkat dalam waktu tiga hingga enam jam setelah infeksi akut sistemik yang disebabkan oleh bakteri, sedangkan pada infeksi virus, proses inflamasi kronik atau proses autoimun kadar PCT tidak meningkat (*Brahms PCT*).

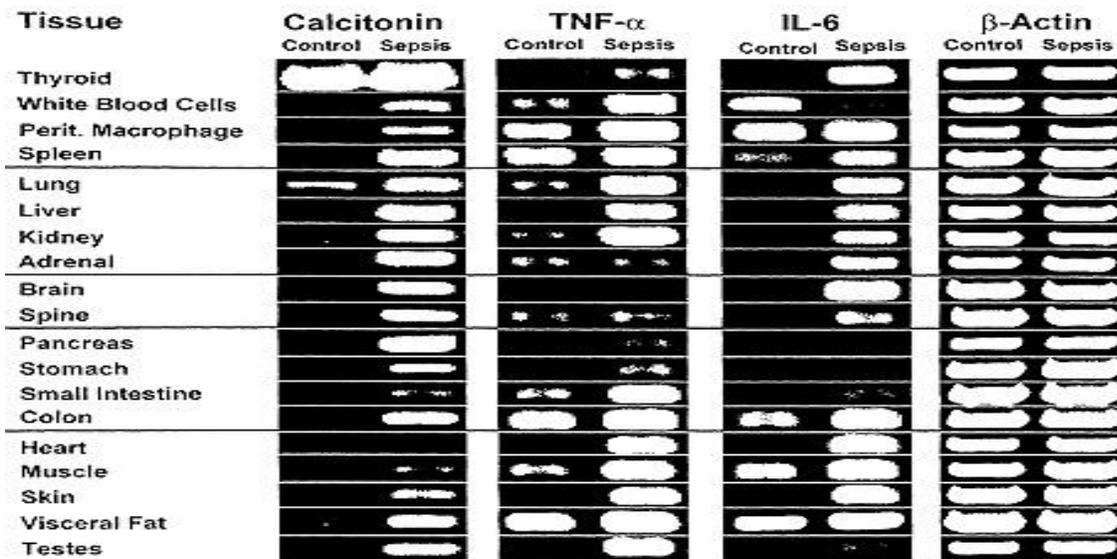
Procalcitonin terdiri dari 116 asam amino dan merupakan prohormon calcitonin (32 asam amino) dengan berat molekul 13 kDa yang disandi oleh gen CALC-1 di lengan pendek kromosom 11. PCT dihasilkan dalam sel C kelenjar tiroid sebagai prohormon calcitonin. Sel C terletak menyebar diantara sel follicular kelenjar tiroid. Secara normal PCT dipecah di dalam tiroid menjadi calcitonin dengan kepekatan sangat rendah pada orang sehat yaitu kurang dari

0,05 ng/uL. Saat infeksi bakteri menyerang tubuh maka akan terjadi ekspresi gen CALC-1 di seluruh jaringan tubuh dan merangsang semua jaringan untuk melepaskan PCT sehingga terjadi peningkatan PCT di sirkulasi (Buchori,2006) (Schneider, 2009). PCT juga dapat meningkat pada karsinoma *C-cell* tiroid dan *small cell carcinoma* (Buchori, 2006).

Pada suatu penelitian dengan menggunakan penghitungan kuantitatif *CT-mRNA expression* dari *Taq-Man PCR* ditemukan bahwa pada saat sepsis PCT secara merata dihasilkan oleh hampir semua jaringan tubuh (hati, paru, ginjal, jaringan lemak, dan otot).

Pelepasan PCT pada proses inflamasi dapat disebabkan akibat induksi secara langsung oleh toksin mikroba (misal: endotoksin) atau secara tidak langsung melalui hormonal atau respon *cell-mediated* (misal: IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6).

Pada penderita sepsis yang disebabkan oleh infeksi virus, ternyata ditemukan bahwa induksi PCT melemah. Hal ini diduga akibat akibat sitokin yang juga dilepaskan selama infeksi virus berbeda dengan infeksi bakteri (misal: *interferon-gamma*) (Maruna, 2000).



Gambar 3 Sekresi PCT Pada Saat Sepsis (*Bhrams PCT*)

Procalcitonin akan meningkat sekitar dua hingga tiga jam setelah adanya infeksi yang disebabkan oleh endotoksin dan akan mencapai puncaknya sekitar enam hingga 12 jam setelah onset, dan tetap meningkat hingga 48 jam (Meisner, 2000).

Jika pengobatan berhasil dan keadaan penderita membaik maka kadar PCT akan menurun, demikian juga sebaliknya, sehingga kadar PCT dapat digunakan sebagai indikator baik atau buruknya keadaan penderita (Meisner, 2000).

### NEUTROPHIL TO LYMPHOCYTE COUNT RATIO

Peningkatan jumlah neutrofil disebabkan IL-6 yang diproduksi oleh makrofag. Sepsis akan merangsang produksi IL-6 sehingga terjadi neutrofilia (Okashah, 2014). Penurunan jumlah limfosit pada keadaan sepsis bakterial disebabkan karena sekresi hormon glukokortikoid yang meningkat dan menekan produksi limfosit pada kelenjar getah bening sehingga terjadi limfositopenia (Nugroho, 2013). Teori lain mengatakan bahwa mekanisme yang bertanggungjawab terhadap proses limfositopenia pada sepsis melibatkan proses marginasi dan

redistribusi limfosit pada sistem limfatik serta adanya percepatan proses apoptosis (Jager CPC, 2010). Proses apoptosis sudah terjadi pada awal terjadinya sepsis, ketika bakteri atau produknya merangsang makrofag untuk melepaskan substansi proapoptotik, seperti TNF- $\alpha$ , NO (*nitrite oxide*) dan glukokortikoid. Keadaan ini akan menekan produksi limfosit. Seiring dengan perkembangan penyakit pada sepsis akan terjadi akumulasi produk apoptosis limfosit yang berperan sebagai stimulus anti inflamasi (Perrino, 2007).

Kortikosteroid yang meningkat selama stres berlangsung mempunyai efek immunosupresif pada sistem limfolentikuler dengan menekan fungsi dan jumlah limfosit sehingga pada akhirnya menurunkan jumlah limfosit.

Peningkatan jumlah netrofil pada sepsis ternyata juga berdampak buruk pada penderita karena netrofil yang sebelumnya diduga sebagai suatu mekanisme untuk mengeradikasi bakteri patogen ternyata juga dapat mengakibatkan kerusakan jaringan yang lebih luas karena peningkatan produksi oksidan dan terjadi peningkatan mediator proinflamasi seperti TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6. Keadaan ini juga akan menekan produk seri lekosit lainnya (Aryana, 2006).

Penelitian yang dilakukan pada pasien yang meninggal dunia karena sepsis dan kegagalan organ multipel (*multiple organ failure*) menunjukkan bahwa sepsis menyebabkan berkurangnya jumlah limfosit yang bermakna melalui proses apoptosis. Berkurangnya jumlah limfosit ini mungkin menguntungkan untuk kelangsungan hidup pasien melalui mekanisme *down-regulating* terhadap respon inflamasi yang berlebihan mengingat limfosit juga berperan untuk memproduksi sitokin proinflamasi dan mengaktifkan makrofag. Berkurangnya jumlah limfosit juga bersifat merugikan karena berarti menurunnya kemampuan sistem imun untuk melawan patogen.

Penelitian yang dilakukan di *Tianjin Medical University General Hospital* pada tahun 2007 hingga 2008 menyebutkan bahwa persentase jumlah limfosit T CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> dan rasio limfosit T CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> pada darah tepi pasien sepsis lebih rendah dibandingkan pasien non sepsis. Hal ini menunjukkan bahwa pada pasien sepsis terjadi kerusakan fungsi imunologis. Persentase limfosit T CD4<sup>+</sup> pada darah tepi dapat menggambarkan keparahan penyakit dan dapat secara efektif memprediksi prognosis pasien sepsis. Makin rendah persentase limfosit T CD4<sup>+</sup> di darah tepi, makin parah sepsis dan makin buruk prognosis (Lin J, 2011).

Lestari *et al* dalam penelitian tentang limfosit (CD4<sup>+</sup>) pada penderita sepsis menyimpulkan bahwa terjadi penurunan jumlah limfosit ( $p < 0,001$ ). Penurunan ini dapat disebabkan oleh ketidakseimbangan respon imun yang didominasi oleh Th2 yang menekan aktivitas Th1 sehingga terjadi supresi respon imun berlebihan yang dapat mempengaruhi prognosis pasien sepsis. Neutrophil akan meningkat pada fase awal respon inflamasi, biasanya disertai limfositopenia. Keadaan ini mungkin disebabkan penekanan terhadap *innate immunity*. Hal ini didukung data bahwa CD4<sup>+</sup> menurun selama sepsis bakteri (Lestari, 2013).

Ljungström *et al*, *University of Gothenburg, Sweden*, melakukan penelitian terhadap 425 penderita dengan membandingkan kadar PCT dengan NLCR pada sepsis bakterial. Ljungström menyimpulkan NLCR dapat diandalkan sebagai biomarker untuk bacteremia (Ljungström, 2015).

Nilai *cut off* NLCR dalam mendeteksi sepsis masih bervariasi. Beberapa peneliti mengajukan nilai *cut off* NLCR, antara lain Holub *et al* dan Okashah *et al* mengemukakan bahwa  $NLCR \geq$

6,2 mendukung sepsis. Luhulima et al menyatakan  $NLCR \geq 6,4$  signifikan mendukung sepsis (Luhulima 2018).

## **IMMATURE TO TOTAL NEUTROPHIL RATIO**

*Immature to Total neutrophil ratio (I/T ratio)* adalah salah satu pemeriksaan, di samping darah lengkap dan CRP, yang dapat membantu diagnosis sepsis pada pasien neonatus. Sama halnya dengan NLCR dan eosinopenia, pemeriksaan I/T rasio hanya memerlukan pemeriksaan apusan darah biasa.

Setelah apusan darah dengan pengecatan Wright atau Giemsa dibuat, maka kita hanya Perlu melakukan diff seri leukosit seperti biasa yaitu hitung jenis per 100 leukositnya. Dalam 100 leukosit tersebut kita hitung berapa jumlah dari masing-masing jenis leukosit. Perhitungan *I/T ratio* didapat dari pembagian jumlah netrofil imatur oleh jumlah total seluruh bentuk netrofil.

Yang dimaksud dengan netrofil imatur disini adalah bentuk netrofil stab, metamielosit, mielosit dan promielosit sedangkan jumlah total netrofil adalah keseluruhan jumlah dari semua bentuk netrofil baik yang imatur dengan segmen. Adanya peningkatan *I/T ratio* secara tidak langsung menunjukkan adanya *shift to the left* dari sebaran hitung jenis leukosit.

Normal dari *I/T ratio* adalah  $<0,2$ , jika melebihi 0,2 menunjukkan kemungkinan adanya infeksi bakteri berat atau sepsis. Perlu diingat I/T rasio harus ditunjang pemeriksaan yang lain, baik pemeriksaan fisik maupun pemeriksaan laboratorium lain.

Fungsi neutrofil merupakan salah satu mekanisme pertahanan tubuh. Pada neonatus jumlah neutrofil beragam. Jumlah keseluruhan neutrofil yang normal di bayi baru lahir adalah 1800/uL, lalu meningkat hingga 7200/uL pada 12 jam kehidupan dan kemudian menurun dan menetap di 1800/uL setelah umur 72 jam sehingga dalam keadaan normal nilai I/T rasio adalah  $\leq 0,16$  pada saat lahir dan menurun hingga 0,12 setelah umur 72 jam. Jika terjadi inflamasi atau Infeksi

terutama bakteri maka akan menyebabkan pelepasan neutrofil ke dalam aliran darah, sehingga akan meningkatkan jumlah leukosit. Pada Infeksi bakteri akut dijumpai pergeseran ke kiri dari neutrofil, yakni dengan banyak dijumpai bentuk imatur.

$$I/T \text{ ratio} = \frac{(\text{stab} + \text{metamielosit} + \text{mielosit} + \text{promielosit})}{(\text{segmen} + \text{stab} + \text{metamielosit} + \text{mielosit} + \text{promielosit})}$$

*Immature to Total neutrophil ratio* rasio masih dipercaya sebagai salah satu uji yang dapat diandalkan terutama pada neonatus, namun beberapa peneliti menganjurkan bahwa I/T rasio tidak dapat berdiri sendiri sebagai biomarker sepsis (bastiana 2010)

### **MONOCYTE DISTRIBUTION WIDHT**

Monosit adalah bagian dari seri leukosit yang termasuk dalam *innate immune system* dimana monosit termasuk mekanisme pertahanan tubuh yang pertama untuk melawan Infeksi.

Saat bakteri invasi tubuh dan menimbulkan Infeksi hingga sepsis maka mediator proinflamasi seperti IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF $\alpha$  dikeluarkan oleh neutrophil dan monosit.

Prekursor myeloid untuk monosit di sumsum tulang berdiferensiasi menjadi promonosit dan akhirnya menjadi monosit. Usia monosit disirkulasi berkisar 1 – 3 hari. Morfologis monosit berdiameter 10 hingga 18  $\mu\text{m}$ . Setelah 3 hari monosit akan bermigrasi ke jaringan berubah menjadi makrofag dan sel dendritik (Elena A, 2018).

Monosit dan sel dendritik memiliki fungsi imunologis yang beragam antara lain fagositosis, presentasi antigen, dan produksi sitokin. Fungsi ini diatur oleh sejumlah reseptor permukaan leukosit, yaitu:

- a) CD 14; merupakan kompleks reseptor untuk liposakarida bakteri dan protein
- b) CD163 biasanya akan mendeteksi fragmen membran/komponen sel lain yang rusak

- c) Beberapa reseptor untuk *Fc regions IgG*: CD64 (*FcγR1, high-affinity receptor*), CD32 (*FcγR2, medium-affinity receptor*) dan CD16 (*pro-inflammatory monocytes*)
- d) Reseptor lain yang bertugas untuk interaksi dengan limfosit dan sitokin

Dalam keadaan normal monosit didominasi oleh CD 14 (80–90% dari monosit di perifer) dan sebagian kecil monosit diekspresi oleh kombinasi CD16 dan CD 14, namun akan meningkat pada inflamasi dan stimulasi sitokin. Monosit *nonclassical subtypes* yaitu monosit yang mengalami penurunan CD 14 dan peningkatan CD 16 berkisar (5 – 9%) dari populasi normal monosit. *Nonclassical subtypes* ini akan meningkat pada keadaan sepsis, HIV, Diabetes, TBC dan infeksi lainnya.

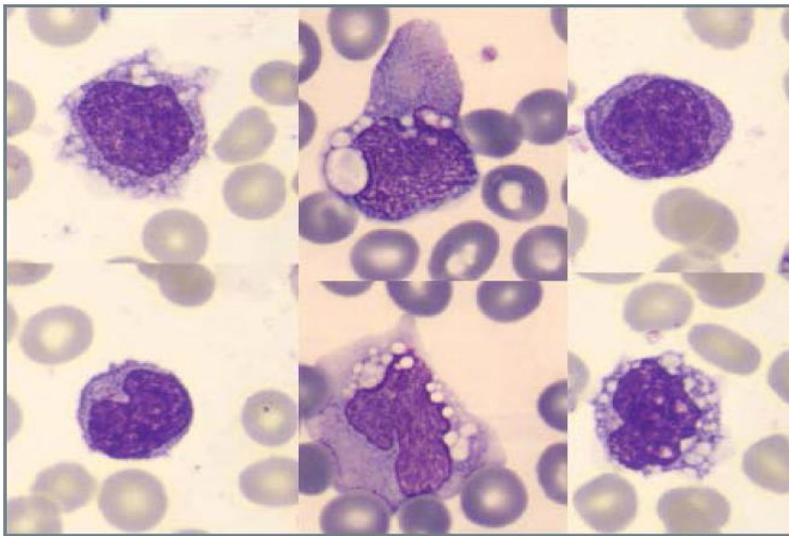
Mukherjee et al mengemukakan tentang fungsi monosit sebagai berikut:

- a) *Classical monocyte* adalah sekelompok monosit yang bersifat fagosit tanpa inflamasi,
- b) *Nonclassical subtypes*: monosit yang aktif pada inflamasi dan menggambarkan presentasi dari antigen
- c) *Intermediate subtypes*: yang memiliki fungsi fagosit dan inflamasi

Penelitian terbaru menunjukkan jumlah monosit menurun pada awal infeksi yang dipicu oleh lipopolysaccharide (LPS). Penurunan ini diduga karena monosit migrasi ke jaringan dan berdiferensiasi menjadi makrofag dan sel dendritik. Keadaan ini akan membuat monosit memiliki populasi yang heterogen dalam hal fenotipe, ukuran, morfologi inti, profil gen dan fungsi. Pada sepsis keanekaragaman ini akan lebih menonjol karena perubahan fungsional dari monosit sehingga menghasilkan variasi morfologi monosit (Elena A, 2018).

Crouser et al. meneliti tentang variasi morfologi monosit pada kasus inflamasi. Variasi ini digambarkan pada *monocyte distribution width* (MDW), dan hasil penelitiannya menyimpulkan

bahwa MDW dapat diandalkan untuk mendeteksi sepsis. Perbedaan morfologi monosit pada inflamasi dapat diukur dengan hematoanalyzer DxH 800. Studi ini menunjukkan bahwa variasi anisocytosis monosit ini memberikan nilai tambah yang signifikan dalam mendeteksi sepsis. (Elena A, 2018), (Elliott D, 2019).



Gambar 4, Berbagai macam bentuk dan ukuran monosit (Elena A 2018)

## Penutup

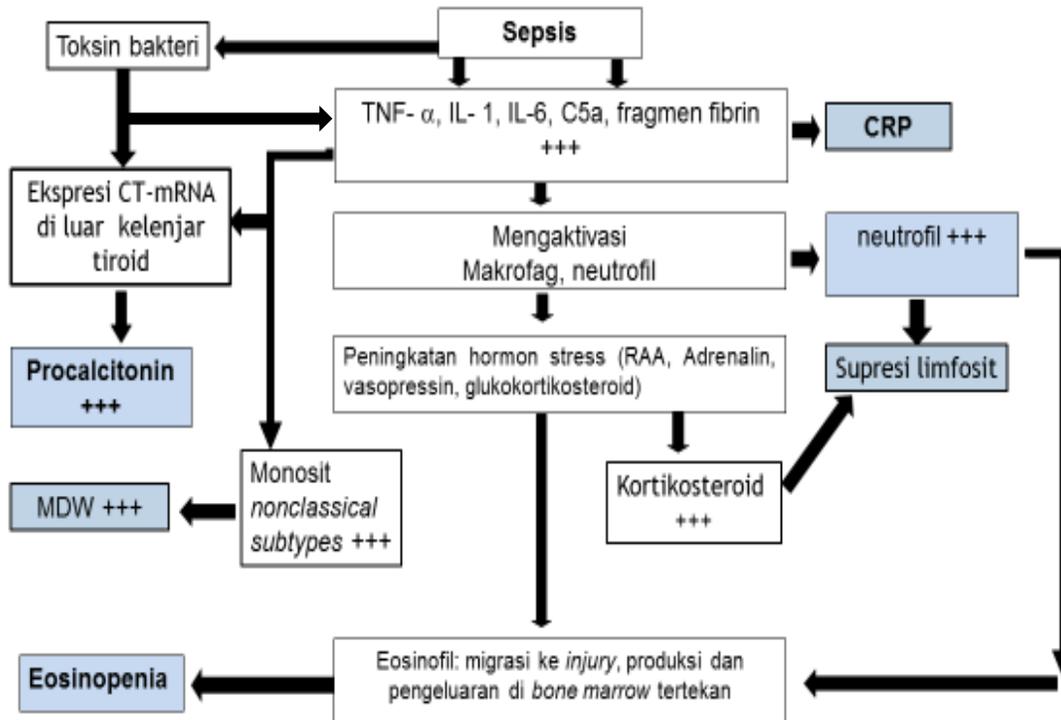
Seperti telah di bahas maka masing – masing biomarker sepsis diatas memiliki keunggulan dan kekurangan, sehingga dibutuhkan kejelian dan ketelitian klinisi untuk menganalisis data yang ada.

Eosinopenia, NLCR, *IT Ratio* merupakan biomarker sederhana yang mudah diperiksa, murah, dan menginterpretasi menginterpretasinya, disamping itu sensitivitas dan spesifisitas cukup tinggi. Hal ini sangat membantu klinisi terutama untuk fasilitas kesehatan primer.

Procalcitonin, CRP, MDW juga memiliki sensitivitas, spesifitas yang tinggi, bahkan PCT dapat digunakan untuk menentukan tingkat keparahan penderita dan *guide line* terapi antibiotik,

sehingga memudahkan klinisi dalam menangani penderita sepsis, namun biomarker ini memerlukan alat khusus dalam pemeriksaannya.

Pada gambar 4 adalah rangkuman mekanisme berbagai biomarker sepsis yang telah diuraikan diatas, demikian juga pada tabel 1 kita dapat melihat kelebihan dan kekurangan masing – masing biomarker sepsis.



Gambar 5, Rangkuman mekanisme biomarker sepsis.

Tabel 1; Biomarker Sepsis Bakterial

No	Nama Biomarker	Keunggulan	Kekurangan
1	Procalcitonin	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Sensitivitas dan spesifisitas tinggi</li> <li>• Dapat digunakan sebagai pemantau terapi</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Harga mahal</li> <li>• Memerlukan alat khusus</li> </ul>

2	CRP	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Sensitivitas tinggi, spesifitas sedang</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Memerlukan alat khusus</li> </ul>
2	Eosinopenia	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Sensitivitas dan spesifitas sedang</li> <li>• Murah dan sederhana pemeriksaannya</li> <li>• Dapat digabungkan dengan NLCR tanpa memerlukan pemeriksaan baru</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Tidak dapat sebagai pemantau terapi</li> <li>• Belum ada penelitian jika penderita mengalami eosinofilia</li> </ul>
3	NLCR	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Sensitivitas dan spesifitas tinggi</li> <li>• Murah dan sederhana pemeriksaannya</li> <li>• Dapat digabungkan dengan eosinopenia tanpa memerlukan pemeriksaan baru</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Tidak dapat sebagai pemantau terapi.</li> <li>• Belum ada penelitian pada penderita yang mengalami limfositopenia</li> </ul>
4	I/T Rasio	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Digunakan pada neonatus</li> <li>• Murah</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Sensitivitas dan spesifitas rendah</li> <li>• Harus digabungkan dengan biomarker lain.</li> <li>• Hanya untuk neonatus</li> </ul>
5	MDW	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Mudah digunakan</li> <li>• Spesifitas dan sensitivitas tinggi</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Memerlukan alat khusus</li> </ul>

## Pustaka

1. Abidi K, Khoudri I, Belayachi J, Madani N, Zekraoui, Zeggwagh, Abouqal, Eosinopenia is a reliable marker of sepsis on admission to medical intensive care units, critical care 2008,12:R59(doi:10.1186/cc6883), diunduh 1 november 2019 dari <http://ccforum.com/content/12/1/R59>, 24/3/2011
2. Aryana IGPS, Konsep Baru Kortikosteroid Pada Penanganan Sepsis, Tinjauan Pustaka, bagian/SMF Ilmu Penyakit Dalam FK UNUD/RS Sanglah Denpasar-Bali, Dexa Medica no 4 volume 19, Oktober – Desember 2006.
3. Bass DA, Gonwa TA, Szejda P, Cousart MS, DeChatelet LR, McCall CE: Eosinopenia of acute infection: production of eosinopenia by chemotactic factors of acute inflammation. J Clin Invest 1980, 65:1265-1271, diunduh 1 november 2019 dari <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC371463/pdf/jcinvest00690-0017.pdf>
4. Bass DA, Behavior of Eosinophil Leukocytes in Acute Inflammation, Journal of Clinical Investigation volume 56, October 1975. 870 – 879 Nuffield Department of Clinical Medicine, University of Oxford, Oxford, England, diunduh 3 november 2019 dari <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC301942/>
5. Bastiana, Immature to Total Neutrophil (I/T) Ratio sebagai penunjang Diagnosis Sepsis Neonatorum, diunduh 3 november 2019 dari [https://www.researchgate.net/publication/328279370\\_Immature\\_to\\_Total\\_Neutrophil\\_IT\\_Ratio\\_sebagai\\_penunjang\\_Diagnosis\\_Sepsis\\_Neonatorum](https://www.researchgate.net/publication/328279370_Immature_to_Total_Neutrophil_IT_Ratio_sebagai_penunjang_Diagnosis_Sepsis_Neonatorum)
6. Budianto, Pengaruh Penambahan Deksametason Dosis Tinggi Sampai 2 Hari Dalam Menurunkan Mortalitas Sepsis, Mempercepat Hilangnya SIRS dan Memperpanjang Hari Kematian Sepsis, diunduh 3 november dari [http://papdiplg.multiply.com/journal/item/6/Pengaruh\\_Penambahan\\_Deksametason\\_Dosis\\_Tinggi\\_Pada\\_Sepsis\\_KOPAPDI\\_XIII\\_Palembang\\_2006](http://papdiplg.multiply.com/journal/item/6/Pengaruh_Penambahan_Deksametason_Dosis_Tinggi_Pada_Sepsis_KOPAPDI_XIII_Palembang_2006), 13/4/2011
7. Burdette SD, Systemic Inflammatory Response Syndrome, emedicine, diunduh 3 november 2019 dari <http://emedicine.medscape.com>
8. Buchori, Diagnosis Sepsis Menggunakan Procalcitonin, tinjauan pustaka, Indonesian Journal of Clinical Pathology and Medical Laboratory, vol 12 no 3, Juli 2006 hal. 131-137, diunduh 1 november dari <http://journal.unair.ac.id/filerPDF/IJCPUL-12-3-06.pdf>
9. Brahm PCT, Measuring Principle, Thermo Scientific, diunduh 2 november 2019 dari [http://www.procalcitonin.com/default.aspx?tree=\\_4\\_3\\_0&key=liais2](http://www.procalcitonin.com/default.aspx?tree=_4_3_0&key=liais2)
10. Elena A, The Role of Monocytes in the Progression of Sepsis, <https://media.beckmancoulter.com/media/docs>, 3 november 2019
11. Elliott D, Monocyte Distribution Width: A Novel Indicator of Sepsis-2 and Sepsis-3 in High-Risk Emergency Department Patients, diunduh dari <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6629174/>, 2 november 2019

12. Guo, C5a, a Therapeutic Target in Sepsis, University of Michigan Medical School, Dept. of Pathology, Ann Arbor, Michigan 48109-0602, USA, diunduh 2 november dari <http://www.benthamscience.com/pri/samples/pri1-1/Guo.pdf>
13. Gill H, Maqy N, Mauny F, Dupone JL, Value of eosinopenia in inflammatory disorders: an "old" marker revisited, Service de médecine interne, praticien hospitalier, centre hospitalier universitaire Jean-Minjoz, 25000, Besançon, France, diunduh 2 november dari <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12829215>
14. Jager CPC et al: Lymphocytopenia and neutrophil-lymphocyte count ratio predict bacteremia better than conventional infection markers in an emergence unit, Critical care med. 2010, 1-8, diunduh 1 november 2019 dari <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3219299/>
15. Kresno SB, Aspek Biologi Molekuler Sepsis. Dalam Oesman F, Setiabudy RD (editor), Pendidikan Berkesinambungan Patologi Klinik 2009, Jakarta, Departemen Patologi Klinik Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia 2009: 90-100.
16. Kawthalkar, essential of clinical pathology, patologi klinik, downloaded at [patologiklinik.com/2018/03/15/c-reactive-protein-crp-sebagai-protein-fase-akut/](http://patologiklinik.com/2018/03/15/c-reactive-protein-crp-sebagai-protein-fase-akut/)
17. Lin J: Clinical significance of the change of T lymphocyte subset in the patient with sepsis, Medical science articles. Diunduh dari <http://www.medical-science.net/emergency-medicine/> [Accessed on Sept 25th, 2011]
18. Lestari EW, CD4+ T Lymphocyte as a prognosis predictor in sepsis patients, Media clinical pathology and medical laboratory volume: 19 - No. 3 Terbit: 1-2013, diunduh. 3 november 2019 dari [http://journal.unair.ac.id/filerPDF/abstrak\\_57839\\_tpjua.pdf](http://journal.unair.ac.id/filerPDF/abstrak_57839_tpjua.pdf)
19. Luhulima D, Eosinopenia dan Procalcitonin dalam Sepsis, [https://www.researchgate.net/publication/328279670\\_EOSINOPENIA\\_DAN\\_PROCALCITONIN\\_DALAM\\_SEPSIS](https://www.researchgate.net/publication/328279670_EOSINOPENIA_DAN_PROCALCITONIN_DALAM_SEPSIS), 1 november 2019
20. Ljungström, Neutrophil to lymphocyte count ratio performs better than procalcitonin as a biomarker for bacteremia and severe sepsis in the emergency department, 35<sup>th</sup> International Symposium on Intensive Care and Emergency Medicine, Brussels, Belgium, 17-20 March 2015 Published: 16 March 2015, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4470638/>, diunduh 1 november 2019.
21. Luhulima D, Neutrophil-lymphocyte Count Ratio in Bacterial Sepsis, diunduh 1 november 2019 dari <https://indonesianjournalofclinicalpathology.org/index.php/patologi/article/view/1204>,
22. Meisner M., Procalcitonin (PCT) A new, innovative infection parameter. Biochemical and clinical aspects, ISBN: 3-13-105503-0, Thieme Stuttgart, New York 2000, diunduh 36 Oktober 2019 dari <http://www.procalcitonin.com>
23. Nicola R; Role of C-Reactive Protein at sites inflammation and infection; frontier in immunologi, downloaded at [ncmb.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5908901/pdf/fimmu-09-00754.pdf](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5908901/pdf/fimmu-09-00754.pdf), 1 november 2019.
24. Nugroho Adi et al: Hubungan antara rasio neutrofil-limfosit dan skor sequential organ failure assessment pada pasien yang dirawat di ruang intensive care unit, JAP. 2013; 1(3):

- 189-96, diunduh 1 November 2019 dari <http://journal.fk.unpad.ac.id/index.php/jap/article/view/198>
25. Okashah A: Ratio Ratio of neutrophil to lymphocyte counts as a marker for sepsis and severe sepsis in intensive care unit. *Opinion in anesthesia and intensive care unit*. 2014. 21: 39-45. Diunduh 28 Oktober 2019 dari <https://pdfs.semanticscholar.org/f33b/33f1ca0b2f45d4a3a5fe671d5ed3be5ca4d5.pdf>
  26. Perrino J et al: Prevention of immune cell apoptosis as potential therapeutic strategy: lymphocyte apoptosis in sepsis, *Emerging infectious diseases*, 13(2), pp. 191-198, 2007.
  27. Slade et al, the Surviving Sepsis Campaign: Raising Awareness to Reduce Mortality, diunduh 1 november 2019, dari <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC154124/pdf/cc1876.pdf>, 18/4/2011.
  28. Shaaban et al, Eosinopenia: Is it a good marker of sepsis in comparison to procalcitonin and C-reactive protein levels for patients admitted to a critical care unit in an urban hospital?, diunduh 3 November 2019 dari <http://ccforum.com/content/12/1/R59>,
  29. Schneider HG: Procalcitonin for the Clinical Laboratory: A Review. *Clinical Laboratory and Hospital News*, Surabaya edisi 2, 2009, h 4-7
  30. Van HW, HachimiIdrissia SJ, Eosinopenia as Early Marker of Severe Bacterial Infection in Children, *Pediatric Intensive Care of The "Universiteit Ziekenhuis Brussel"*, Laarbeeklaan, Brussels, Belgium, diunduh dari 2 November 2019 [http://adc.bmj.com/cgi/content/meeting\\_abstract/93/2\\_MeetingAbstracts/ps199](http://adc.bmj.com/cgi/content/meeting_abstract/93/2_MeetingAbstracts/ps199).