LUAS DEFЕК MENINGOKEL BERHUBUNGAN DENGAN KADAR *TRANSFORMING GROWTH FACTOR β 1 (TGF- β 1)* DAN *INSULINE-LIKE GROWTH FACTOR-1 (IGF-1)* DALAM TULANG

(THE WIDE DEFECT OF MENINGOCELE CORRELATES WITH *TRANSFORMING GROWTH FACTOR β 1 (TGF- β 1)* AND *INSULINE-LIKE GROWTH FACTOR-1 (IGF-1)* LEVEL IN SKULL)

Moch. Istiadjid E.S.

Laboratorium Ilmu Bedah Fakultas Kedokteran Unibraw Malang

ABSTRACT

Meningocele pathogenesis is based on skull defect that occurs since the first three month of fertilization period. Through that defect, meninges, cerebrospinal liquid, and cerebral parenchyma is protruded. Meningocele can be caused by folic acid deficiency that had proved correlation with TGF- β 1 and IGF-I level, both in maternal blood or baby rat's skull. Folic acid deficiency also causes increasing the number of apoptosis and necrosis cells death in baby's skull. TGF- β 1 and IGF-I are growth factors that stimulate bone synthesis. The purpose of this study is to explore the correlation between TGF- β 1 and IGF-I level in skull on side defect of meningocele patients and the width of skull defect to obtain the role of the two growth factors in meningocele teratogenesis perspective. Eight meningocele patients that were performed excision by standard procedure have taken a few of bone specimen on side defect to count TGF- β 1 and IGF-I levels with immunochemistry technique. Wide defect was determined by measuring defect's diameter, using Martin anthropometer. The correlation between TGF- β 1 and IGF-I skull level and defect's width was analyzed by SEM (structural equation modeling) statistic. There was significant negative-correlation between that variable, that means the lower of the two growth factors level is wider of skull defect. TGF- β 1: $r = -0.648$, $p = 0.009$; IGF-I: $r = -0.426$, $p = 0.025$.

Key words: Meningoencephalocele, Skull defect, TGF- β 1, IGF-I.

PENDAHULUAN

Meningocele adalah kelainan kongenital berupa penonjolan selaput otak dan cairan otak lewat defek (lubang) pada tulang kepala. Bila sebagian jaringan otak ikut menonjol, disebut meningoensefalokel atau ensefalokel (1,2,3). Kelainan ini merupakan bagian dari gangguan yang dinamakan defek tabung saraf (*neural tube defects, NTD's*) (1,4,5,6).

Prevalensi tertinggi meningocele adalah di Asia Tenggara, khususnya di kalangan ras Melayu. Frekuensi pasien meningocele di beberapa klinik bedah saraf di Jawa Timur (Surabaya dan Malang) lebih tinggi (8,7%) dibanding di Jawa Tengah (Solo, Yogya dan Semarang) (6,1%) (7). Penderita umumnya berasal dari keluarga tidak mampu dan berpendidikan rendah. Cacat yang terjadi berupa deformitas pada wajah yang berdampak gangguan kosmetik, fungsional, mental, sosial, dan bahkan kematian. Untuk mengobatinya harus dilakukan pembedahan yang memerlukan biaya relatif sangat mahal, dengan risiko yang cukup besar.

Secara embriologis ada beberapa teori yang mencoba menjelaskan sebab kegagalan penutupan tabung saraf. Yang banyak dianut para peneliti adalah teori gangguan neurulasi, yaitu tetap bertahannya perlekatan antara ektoderm neural (saraf) dengan ektoderm permukaan (epidermis) pada garis tengah sewaktu proses organogenesis di awal kehamilan, sehingga terjadi hambatan migrasi sel-sel mesoderm pembentuk tulang di

tempat adesi dua lapisan ektoderm itu. Keadaan ini menyebabkan di daerah itu tidak ada pembentukan tulang sehingga timbul defek. Teori ini disebut teori 'non-separasi' dari Sternberg (8).

Belum ditemukan penjelasan yang mendasari tetap melekatnya kedua lapisan ektoderm tersebut. Diduga terdapat peranan substansi mediator berupa beberapa faktor pertumbuhan (*growth factor*). Faktor pertumbuhan yang berfungsi mensintesis jaringan tulang adalah *Transforming Growth Factor- β (TGF- β)*, khususnya isomer *TGF- β 1*, dan *Insuline-like Growth Factor-I (IGF-I)* (3,9,10,11). Tulang kepala tersusun dari bermacam-macam sel tulang yang terdiri osteoblas, khondroblas, osteosit dan khondrosit, dan matriks tulang antara lain kolagen tipe-1, kolagen tipe-2, osteokalsin, osteospondin, dan kartilago. Fungsi sel tulang dipacu oleh dua faktor pertumbuhan, yaitu *TGF- β 1* dan *IGF-I* (11,12,13,14). Sudah ada beberapa penelitian yang mengungkap aktifitas dua faktor pertumbuhan tersebut dalam memacu pertumbuhan dan pembentukan tulang, misalnya pada kasus kraniosinostosis (sutura mengalami fusi sempurna sebelum waktunya) dan akromegali, kadar *TGF- β 1* dan *IGF-I* lebih tinggi dibanding kadarnya yang normal (10,14).

Selain berperan dalam proses fertilisasi dan embriogenesis, *TGF- β 1* dan *IGF-I* telah dibuktikan berfungsi sebagai faktor pertumbuhan tulang pada hewan coba. Kombinasi keduanya yang ditambahkan secara eksogen (aplikasi sistemik) pada kelinci percobaan menyebabkan percepatan penutupan defek kalvaria, demikian juga halnya bila kedua *growth factor* tersebut diberikan secara aplikasi lokal (10,15). *TGF- β 1* dan *IGF-I* telah pula dibuktikan dapat menstimulasi pertumbuhan tulang baru, baik secara endokondral maupun intramembran (9,16). Sampai saat ini belum ada penelitian yang mengungkap korelasi

Jurnal Kedokteran Brawijaya, Vol. XX, No.3, Desember 2004
Korespondensi: M. Istiadjid E.S.; Laboratorium Bedah FK Unibraw
Malang, Jl. Veteran, Malang 65145. Telp. 0341-580993; Fax.0341-
564755

kedua faktor pertumbuhan tadi dengan defek tulang pada meningokel.

Seperti telah diungkap di atas, yang mendasari terjadinya meningokel adalah fusi tulang kepala tidak sempurna sehingga terbentuk defek. Dapat diduga bahwa pada saat terjadi proses fusi tulang kepala terdapat kekurangan kadar satu atau lebih dari faktor pertumbuhan yang berfungsi untuk menstimulasi sintesis tulang, yaitu *TGF- β 1* dan atau *IGF-I*. Penelitian ini bertujuan untuk mengungkap hubungan antara kadar kedua *growth factor* dalam tulang kepala pasien meningokel di tepi defek dengan luas defek tulang yang ada, dalam rangka memperjelas proses teratogenesis meningokel.

METODE

Rancangan penelitian ini adalah *observasional Analitic cross-sectional* (17). Bahan penelitian adalah tulang di tepi defek dari delapan pasien meningokel yang diambil sedikit ($\pm$ 2mm X 2mm) pada waktu dilakukan pembedahan dengan metode standar. Sampel tulang kemudian dibagi dua yang dari setiap bagian diambil satu irisan, yaitu irisan tepi defek dan irisan luar defek. Terhadap bahan penelitian (iris) tersebut dilakukan pengukuran kadar *TGF- β* dan *IGF-I* dengan metode imunohistokimia. Juga dilakukan pengukuran luas defek menggunakan *anthropometer* dari Martin dengan metode kaliper gesek (*sliding caliper*). Karena bentuk defek tidak beraturan, maka diukur beberapa jarak tertentu sehingga dapat dimungkinkan untuk mengukur luas (luas) defek tersebut. Luas defek tulang ditentukan dengan bantuan komputer program *Adobe Photoshop*.

Data dianalisis dengan uji statistik SEM (Structural Equation Modeling). Teknik imunohistokimia yang dikerjakan untuk mengukur kadar *TGF- β 1* dan *IGF-I* dalam tulang adalah sebagai berikut:

1. Setelah diambil, sediaan tulang kemudian difiksasi dengan formalin *phosphate-buffered* 10% dalam suhu 4 derajat Celcius selama 48 jam, diteruskan dengan fiksatif Bouin dalam suhu dan waktu yang sama. Sediaan kemudian dicuci dengan air yang disuling dan didekalsifikasi dalam asam asetat 10%, formaldehid 10% dan salin 0,45% selama 2 sampai 7 hari, sebelum dilakukan dehidrasi dalam etanol dan parafin.
2. Kemudian dilakukan irisan serial setebal 4 μ m dan diletakkan di dalam *slide TESPA-coated* untuk dicat dengan hematoksin dan eosin serta untuk imunolokalisasi dari faktor pertumbuhan tulang.
3. Irisan jaringan kemudian dideparafinasi dalam *xylene*, rehidrasi dan diinkubasi dalam salin *TRIS-buffered* dan Triton

X-100 0,3% di dalam suhu ruangan selama 15 menit, dilanjutkan dengan salin *TRIS-buffered* dan metanol absolut. Aktivitas peroksidase endogen dicampur dengan hidrogen peroksida 0,6% dalam metanol, dilanjutkan dengan pencucian dalam salin *TRIS-buffered* dan albumin serum *bovine* 0,1% selama 5 menit.

4. Semua irisan kemudian direndam dalam hialuronidase (1 mg/ml dalam 100 mM natrium asetat, NaCl 0,85%, dengan pH 5,5) pada suhu 37 derajat Celsius untuk *TGF- β 1* ; dan dengan tripsin 0,125% dalam salin *phosphate-buffered* selama 15 menit, dibilas dalam salin *TRIS-buffered* dan albumin serum bovin 0,1%, kemudian diblok dengan serum kambing 1,5% dalam normal salin, *TRIS-buffered* dan albumin serum bovinum pada suhu 37 derajat Celsius selama 20 menit.
5. Irisan kemudian ditetesi berturut-turut dengan :
  - a) antisera primer untuk setiap isoform *TGF- β 1* yang diencerkan dalam cairan *blocking* dengan konsentrasi akhir 2,5 ug/ml, untuk *IGF-I* diencerkan dalam cairan *blocking* 1: 2500,
  - b) antibodi sekunder dari domba yang dilakukan biotinilasi,
  - c) kompleks peroksidase avidin-biotin,
  - d) dilanjutkan dengan identifikasi peroksidase dalam irisan jaringan dengan cat Cromogen 3,3'-diaminobenzidine. Sebagai kontrol negatif digunakan IgG kelinci dengan konsentrasi 5,0 μ g/ml.
6. Irisan kemudian di *counterstain* dengan hematoksin-eosin dari Mayer-Harris. Pengecatan hematoksin-eosin dimaksudkan untuk mengidentifikasi dan mencari karakteristik dari interpretasi pengecatan imunologis *growth factor*.
7. Pengecatan imunohistokimia dianalisis pada fotomikroskop Zeiss, *slide* dibaca oleh dua peneliti, dan pengecatan merah-kecokelatan hasil dari kromogen DAB dihitung. Fotomikrograf diletakkan diatas mikroskop Olympus. Data yang diperoleh merupakan data kualitatif, yang kemudian dihitung secara semi-kuantitatif. Pada sediaan ditentukan dulu daerah yang akan dihitung (*counting area*) berdasarkan pewarnaan yang paling banyak, pada pembesaran 100X. Daerah yang akan dihitung dibagi 5 wilayah lapangan pandang dan masing-masing wilayah dihitung setiap wilayahnya dengan 5 kotak kamar hitung. Kadar *growth factor* ditentukan dengan menghitung jumlah kotak imunoperoxidase positif (berwarna merah-kecokelatan), baik yang terletak di intrasel maupun matriks, perlapang-pandang secara *double blind* oleh dua orang pengamat yang hasil pengamatannya tidak berbeda bermakna.

HASIL PENELITIAN

Tabel 1. Kadar *TGF-β1* Dan *IGF-I* Dalam Tulang Serta Luas Defek Pada Pasien Meningokel

Identitas				Kadar (ng/ml)				Luas defek (mm2)
				Luar defek		Tepi defek		
No. pasien	Usia (bl)	Seks	Hb (gr%)	TGF-β1 (ng/ml)	IGF-1 (ng/ml)	TGF-β1 ng/ml	IGF-1 (ng/ml)	
1.	18	L	10.1	8	9	6	9	16.7466
2.	12	L	10.6	7	6	4	3	68.4000
3.	4	P	13.1	7	7	4	3	56.2600
4.	20	P	11.5	3	2	2	1	270.9210
5.	48	L	11.2	2	3	1	2	835.7880
6.	6	P	11.0	4	4	2	4	155.6456
7.	36	L	12.1	8	7	5	8	39.5732
8.	11	P	11.9	5	6	4	3	75.2640
Rerata ± SD				5.5 ± 2.2	5.4 ± 2.1	3.5 ± 1.6	4.1 ± 2.7	

Keterangan:

- L = Laki-laki

- P = Perempuan

- Luar defek = irisan yang paling jauh dengan defek

- Tepi defek = irisan yang paling dekat dengan defek

- Data TGF dan IGF dihitung dengan jumlah kotak dalam kamar hitung imunoperoxidase positif (warna merah-cokelat) perlapang pandang

- Luas defek dihitung dengan program komputer Adobe Photoshop

Gambar 1. Hubungan Kadar *TGF-β1* Dan *IGF-I* Tulang Dengan Luas Defek Pasien Meningokel (Hasil Analisis SEM)**Korelasi kadar *TGF-β1* dan *IGF-I* dalam tulang dengan luas defek tulang kepala pasien meningokel**

Dengan memperhitungkan variabel perancu usia dan jenis kelamin, terlihat korelasi yang sangat kuat kadar *TGF-β1* dan *IGF-I* dalam tulang di defek dengan luas defek tulang kepala pada meningokel. Juga terlihat bahwa korelasi *TGF-β1* lebih kuat dibanding pengaruh *IGF-I* (SEM, *TGF-β1* : $p = 0,009$, $r = -0,648$; *IGF-I* : $p = 0,025$, $r = -0,426$). Kadar *TGF-β1* dan *IGF-I* di dalam

tulang tepi defek secara bermakna lebih tinggi dibanding kadarnya dalam tulang normal (Anova, *TGF-β1* : $p = 0,007$; *IGF-I* : $p = 0,011$). Terlihat perbedaan yang tidak bermakna antara kadar *TGF-β1* dalam tulang tepi defek dengan kadarnya di luar defek (Anova, $p = 0,138$), demikian juga antara kadar *IGF-I* dalam tulang tepi defek dengan kadarnya di luar defek berbeda tidak bermakna (Anova, $p = 0,215$). Rincian perhitungan statistik disajikan pada Tabel 1.

A

B

C

Gambar 2. Tulang pasien meningokel

Keterangan: - pengecatan imunohistokimia metode peroksidase dengan counterstaining Mayer-hematoxylin Human Antibody anti TGF- β 1, pembesaran 200X
- tanda panah ($\rightarrow$) menunjukkan ekspresi TGF- β 1 (warna merah-kecokelatan) pada sediaan C lebih tinggi dibanding sediaan A dan B

A

B

C

Gambar 3. Tulang pasien meningokel

Keterangan: - pengecatan imunohistokimia metode peroksidase dengan counterstaining Mayer-hematoxylin Human Antibody anti IGF-1, pembesaran 200X
 - tanda panah (→) menunjukkan ekspresi IGF-1 (warna merah-kecokelatan) pada sediaan C lebih tinggi dibanding sediaan A dan B

Ekspresi *TGF-β1* dan *IGF-I* dalam tulang kepala pasien meningokel

Untuk memperlihatkan gradasi *growth factor TGF-β1* dan *IGF-I* dalam tulang kepala pasien meningokel, disajikan Gambar 2 dan 3 yang secara berurutan merupakan representasi intensitas ekspresi kedua *growth factor* tersebut (area berwarna merah-kecokelatan) dari yang terendah sampai yang tertinggi. Data deskriptif semikuantitatif telah disampaikan dalam Tabel 1.

Perbedaan histologis tulang kepala pasien dibanding tulang kepala janin tikus adalah:

- struktur lamela matriks tulang lebih padat dan kompak
- tidak ditemukan kondrosit
- tidak ditemukan jaringan kolagen maupun kartilago
- ekspresi *TGF-β1* dan *IGF-I* lebih rendah

DISKUSI

Korelasi kadar *TGF-β1* dan *IGF-I* dalam tulang tepi defek dengan luas defek pada tulang kepala pasien meningokel

Bentuk defek tulang pada pasien meningokel bermacam-macam, umumnya tidak beraturan dan tidak berpola matematis seperti: bundar, elips, segitiga atau segiempat, sehingga sulit untuk mengukur luas/lebar defek secara tepat (6). Ukuran luas defek adalah ukuran yang dihitung dengan program komputer 'adobe photoshop', diharapkan mendekati tepat. Pada penelitian ini didapatkan perbedaan yang bermakna antara kadar *TGF-β1* dan *IGF-I* dalam tulang tepi defek dengan kadarnya dalam tulang yang jauh dari defek ($p = 0,000$ untuk *TGF-β1*, dan $p = 0,065$ untuk *IGF-I*). Kadar kedua faktor pertumbuhan tersebut juga mempunyai korelasi negatif yang kuat dengan luas defek; yaitu semakin rendah kadar, semakin luas defek (analisis SEM untuk *TGF-β1*: $r = -0,648$, $p = 0,009$; untuk *IGF-I*: $r = -0,426$, $p = 0,025$).

Sejauh ini belum didapat penelitian yang menghubungkan variabel kadar *TGF-β1* dan *IGF-I* dalam tulang defek dengan luas defek pasien meningokel. Boonvisut *et al.* (1998) hanya menemukan bahwa luas defek pada meningokel tidak berhubungan dengan besarnya ukuran benjolan meningokel (6). Tingginya tekanan intrakranial yang mempengaruhi besarnya benjolan. Dengan bertambahnya usia pasien, umumnya luas

defek menjadi lebih sempit. Hal ini bisa disebabkan menyempitnya komponen tulang ataupun oleh jaringan fibrosa padat yang menutup defek tersebut, yang kemudian mengalami osifikasi (4,6). Pembentukan tulang dimulai dari tepi defek secara intramembranous dan endokondral karena aktivitas osteosit, khondrosit, osteoblas dan khondroblas (6,18).

TGF-β1 dan *IGF-I* adalah dua faktor pertumbuhan yang terdapat dalam matriks tulang, termasuk tulang di tepi defek. Isoform *TGF-β1* merupakan bagian dari superfamili "peptida pengatur pertumbuhan" yang di dalamnya terdapat *bone morphogenetic protein (BMP)*. Pada awalnya *IGF* ditemukan dan dapat dimurnikan dari tulang (10,14). *TGF-β1* dan *IGF-I* telah dibuktikan beraksi menstimulasi pertumbuhan tulang baru, baik secara endokondral maupun intra-membran (12). Ditemukan pula adanya imunoreaktivitas *TGF-β1* dalam kalus fraktur tulang (12). Aplikasi lokal *TGF-β1* dan *IGF-I* menyebabkan percepatan penutupan defek kranium *in-vivo* (15). Pemberian rekombinan *TGF-β1* dan *IGF-I* menyebabkan penutupan suture tulang kepala tikus Dawley-Sprague (2).

Rendahnya kadar kedua faktor pertumbuhan di tepi defek tulang menyebabkan stimulasi sel-sel tulang (khondroblas, osteoblas, khondrosit dan osteosit) untuk mensintesis matriks ekstrasel (kolagen, kartilagohialin, tulang) terhambat, sebaliknya hambatan aktivitas sel osteoklas untuk meresorpsi tulang menjadi berkurang. Kondisi tersebut diperparah dengan bertambahnya jumlah sel yang mengalami kematian apoptosis dan nekrosis. Akibatnya adalah proses osifikasi dan fusi tulang di daerah tersebut menjadi tidak sempurna sehingga terjadi defek tulang. Dengan demikian, semakin rendah kadar *TGF-β1* dan *IGF-I* dalam tulang menyebabkan defek tulang semakin luas.

Dari uraian teoritik dan empirik di atas dan diperkuat dengan hasil penelitian ini, kiranya dapat dipahami bahwa adanya korelasi-negatif antara kadar *TGF-β1* dan *IGF-I* dengan luas defek pada penderita meningokel adalah sesuatu yang wajar, sesuai dengan hipotesis penelitian. Temuan ini juga membuktikan adanya korelasi tidak langsung defisiensi asam folat dengan terjadinya defek tulang pada meningokel melalui korelasi dan pengaruhnya terhadap kadar faktor pertumbuhan *TGF-β1* dan *IGF-I*.

Defisiensi asam folat berkorelasi positif dengan penurunan kadar kedua faktor pertumbuhan tersebut, baik dalam darah maupun dalam tulang kepala. Defek tulang kepala terjadi karena rendahnya kadar *TGF-β1* dan *IGF-I* dalam tulang kepala dan banyaknya sel pembentuk tulang yang mengalami kematian apoptosis dan nekrosis, sehingga sintesis matriks ekstrasel (kolagen tipe-1 dan 2, kartilago-hialin) mengalami hambatan untuk dapat menyusun jaringan tulang secara normal. Dengan demikian hasil penelitian ini dapat lebih memperjelas mekanisme terbentuknya defek tulang kepala pada pasien meningokel, dikaitkan dengan defisiensi asam folat, serta kadar *growth factor TGF-β1* dan *IGF-I*.

Yang masih memerlukan penjelasan adalah fenomena bahwa defek tulang pasien meningokel di kawasan Asia tenggara lebih banyak terletak di regio basis kranii bagian frontal (nasofrontal, nasoetmoidal dan nasoorbital), sedangkan di kawasan lain terletak lebih banyak di regio oksipital. Peneliti mencoba menjelaskan patogenesis fenomena itu sebagai berikut. Seperti diketahui, regio basis kranii bagian frontal merupakan tempat fusi dari banyak macam tulang yaitu: os frontalis, os nasalis, os etmoidalis, dan dinding orbita. Regio tersebut juga merupakan tempat fusi beberapa tulang yang berasal dari osifikasi secara endo-khondral (basis kranii) dan yang berasal dari osifikasi secara intramembranous (kalvaria). Tempat yang paling rawan untuk terjadinya defek adalah di daerah tempat fusi dari beberapa tulang yang berbeda struktur maupun asalnya, dalam hal ini adalah regio basis kranii bagian frontal. Menurut hemat peneliti, faktor gen memegang peranan sangat penting. Seperti yang sudah diuraikan, dalam pembentukan mesoderm kranial berperan berbagai macam gen, yaitu *Wnt-p3*, *T-box*, *Tlx-2* dan

SRF (19). Kemungkinan ada perbedaan satu atau lebih dari gen-gen tersebut antara ras Mongoloid (Asia Tenggara) dengan ras Negroid (Afrika) dan Kaukasoid (Eropa, Amerika, Australia). Perbedaan gen tersebut mungkin juga yang menyebabkan perbedaan bentuk kepala antara ras Mongoloid yang relatif bulat (brakhisefal) dengan ras Negroid maupun ras Kaukasoid yang lonjong (dolikhosefal), seperti yang diungkap oleh Loekito (1992) (20). Di samping itu berperan pula faktor nutrisi, kebiasaan selama kehamilan muda yang bersifat tradisional lokal, iklim, bulan terjadinya konsepsi dan lain sebagainya. Semua hal itu sesuai dengan etiologi meningokel yang bersifat multifaktorial dan poligenik (8,20).

KESIMPULAN

1. Dari penelitian ini dapat disimpulkan bahwa *growth factor TGF-β1* dan *IGF-I* memegang peranan penting dalam pembentukan tulang kepala pasien meningokel. Dengan demikian kekurangan kadar *TGF-β1* dan *IGF-I* akan berakibat terbentuknya defek tulang kepala.
2. Penelitian ini memperkuat penelitian-penelitian sebelumnya bahwa etiologi meningokel adalah defisiensi asam folat yang mengakibatkan penurunan kadar *TGF-β1* dan *IGF-I* dalam serum ibu dan tulang kepala janin.
3. Dimasa yang akan datang diharapkan kedua *growth factor* tersebut dapat digunakan sebagai pengobatan pasien dengan defek tulang kepala, baik setelah lahir maupun selama bayi dalam kandungan, dengan pemberian secara sistemik, topikal atau intra amniotik.

DAFTAR KEPUSTAKAAN

1. Martinez-Lage JF, Poza M, Sola M, Soler CL, Montalvo CG, et al. *The Child with a Cephalocele: Etiology, Neuroimaging, and Outcome*. Child's Nerv. Syst; 1996; 12: 540-550.
2. Thaller SR, Hoyt J, Tesluk H, and Holmes R. *The Effect of Insulin Growth Factor-1 on Calvarial Sutures in a Sprague-Dawley Rat*. J.Cranio-fac.Surg; 1993; 4: 35.
3. Cohick WS and Clemmons DR. *The Insulin-like Growth Factors*. Ann. Rev. Physiol; 1995; 55: 131-137.
4. Charoonsmith T and Suwanwela C. *Frontoetmoidal Frontoethmoidal Encephalomeningocele with Special Reference to Plastic Reconstruction*. Clin.Plastic Surg; 1984; 1(1): 27-47.
5. Acuna J, Yoo P, Erickson D. *The Prevention of Neural Tube Defects with Folic Acid*. CDC, Pan Am. Health Org; 2000; 1-17.
6. Boonvisut S, Ladpli S, Sujatanond M, Tandha vadana C, Tisavipat N, et al. *Morphology Study of 120 Skull Base Defects in Frontoethmoidal Encephalomeningoceles*. J. Plast. Reconst. Surg; 1998; 101: 1784-1795.
7. Haryo TS dan Istiadid M. *Beberapa Faktor Etiologi Meningokel Nasofrontal*. Jakarta: MABI; 1999.
8. Hoving EW. *Frontoethmoidal Encephalocele, a Study of Their Pathogenesis*. [Disertasi]. Groningen: Rijk Universiteit. 1993.
9. CanalisE, Mc Carthy, T and Centrella M. *Isolation and Characterization of IGF-I (somatomedin-C) from Cultures of Fetal Rat Calvariae*. Endocrinology; 1988; 122: 22-29.
10. Roth DA, Gold LI, Han VKM, McCarthy JG, Sung JJ, et al. *Immunolocalization of Transforming Growth Factor β1, β2 and β3 and Insulin-like Growth Factor-1 in Prematur Cranial Suture Fusion*. Plast. Reconst. Surg.; 1997; 2(99): 300-309.
11. Sirica AE. *Cellular and Molecular Pathogenesis*. Philadelphia: Lippincott-Raven Publ; 1996.
12. Joyce ME, Robertts AB, Sporn MB, and Bolander ME. *Transforming Growth Factor-Beta and the Initiation of Chondrogenesis and Osteogene-Sis in the Rat Femur*. J. Cell. Biol.; 1990; 110: 2195.
13. Massague J, et al. *The Transforming Growth Factor-β Family*. Ann. Rev. Cell Biology; 1998; 6: 597-641.
14. Steed DL. *The Role of Growth Factors in wound healing*, in: A.B. Barbul (ed.) *The Surg. Clin. North. Am.* Philadelphia: W.B. Saunders Publ.; 1997; 77(3): 575-586.
15. Beck LS, Deguzman L, Lee WP, et al. *TGF-β1 Induces Bone Closure of Skull Defects*. J. Bone Miner. Res.; 1991; 6: 1257.
16. Yakar S, Rosen CJ, Beamer WG, Ackert-Bicknell CL, Wu Y. *Circulating Levels of IGF-1 Directly Regulate Bone Growth and Density*. J. Clin. Invest; 2002; 110 (6): 771-781.

17. Sudigdo Sastroasmoro & Sofyan Ismael. *Dasar-dasar Metodologi Penelitian Klinis*. Jakarta: Binarupa Aksara; 1995.
18. Agthong S and Wiwanitkit V. *Encephalomeningocele cases over 10 years in Thailand: a case series*. BMC Neurology; 2002; 2: 3.
19. Larsen WJ. *Human Embryology*, 3th.Ed. New York-Edinburg-London: Churchill livingstone; 2001.
20. Loekito RM. *Hubungan Labiopalatoschisis dengan Konsanguinitas dan Beberapa Ukuran Kepala*. Suatu studi kasus di Timor Tengah Selatan. Disertasi, Univ. Airlangga. 1992.
21. Davids DJ, Sheffield L, Simpson D, White J. *Fronto-ethmoidal Meningoencephaloceles: Morphology and Treatment*. British J. Plastic Surg.; 1984; 37: 271-284.