

Artikel Penelitian

IgM-RF pada Anak Terinfeksi Virus *Dengue* Tidak Berkorelasi dengan Jumlah Trombosit dan Hematokrit

IgM-RF in Children with Dengue Virus Infection Does Not Correlate with Thrombocyte Counts and Hematocrit

Safari W Jatmiko¹, Lisyani Suromo², Edi Dharmana²

¹Departemen Patologi Klinik Fakultas Kedokteran Universitas Muhammadiyah Surakarta

²Magister Ilmu Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro Semarang

ABSTRAK

Banyak teori diajukan untuk menjelaskan patogenesis trombositopenia dan hemokonsentrasi pada Infeksi Virus *Dengue* (IVD), termasuk teori autoimun. Hal ini menimbulkan pertanyaan apakah *Rheumatoid Factor* (RF) yang biasa ditemukan pada pasien autoimun juga ditemukan dan berhubungan dengan perubahan jumlah trombosit dan nilai hematokrit pada pasien IVD. Tujuan penelitian adalah untuk membuktikan hubungan RF dengan jumlah trombosit dan nilai hematokrit pada anak terinfeksi virus dengue. Desain penelitian menggunakan analisis korelatif dengan pendekatan belah lintang dilakukan terhadap 40 pasien yang mengalami demam minimal 4 hari dan memenuhi kriteria diagnostik IVD menurut WHO 2009, usia di bawah 14 tahun, dan diagnosis dikonfirmasi dengan antibodi antidengue. Pasien dengan riwayat penyakit autoimun dan riwayat *immunocompromised* dikeluarkan dari penelitian. Sampel diambil secara konsekutif. Darah rutin diperiksa menggunakan *hematology analyzer* sedangkan RF diperiksa dengan metode aglutinasi lateks. Data diolah dengan uji korelasi Spearman. Hasil penelitian menunjukkan pasien dengan RF (+) sebanyak 62,5%. Hasil uji korelasi RF dan jumlah trombosit menunjukkan nilai $r=0,151$ dengan $p=0,354$ sedangkan hasil uji korelasi RF dan nilai hematokrit nilai $r=0,3$ dengan $p=0,06$. Penelitian ini menunjukkan bahwa tidak terdapat korelasi antara kadar RF serum dengan jumlah trombosit pada pasien IVD dan antara kadar RF serum dengan nilai hematokrit pada pasien IVD, walaupun ada kecenderungan peningkatan kadar RF serum diiringi dengan kenaikan nilai hematokrit.

Kata Kunci: Hematokrit, infeksi virus *dengue*, *rheumatoid factor*, trombosit

ABSTRACT

There are many theories to explain the pathogenesis of thrombocytopenia and hemoconcentration in Infeksi Virus Dengue (IVD), including autoimmune theory. Patients with autoimmune disease usually have high RF levels in their blood. It raises the question whether RF is associated with thrombocyte/platelet count and hematocrit value in IVD patients. The aim of this study was to determine the correlation between RF with platelet count and hematocrit value in IVD patients. This study used correlative analysis with cross sectional approach. This study involved 40 patients who experienced fever of at least 4 days and met IVD diagnostic criteria according to WHO 2009, aged under 14 years, and diagnosis confirmed with antibody antidengue test. Patients with history of autoimmune disease and immunocompromised were excluded. Samples were collected using consecutive sampling method. Platelet and hematocrit were measured using hematology analyzer while RF was checked by using latex agglutination method. The data were statistically analyzed using Spearman correlation test. There were 62.5% patients with RF (+). The results of correlation test between RF and platelets showed $r=0,151$ and $p=0,354$, while correlation test between RF and hematocrit was $r=0,3$ and $p=0,06$. There was no correlation between RF serum levels and platelets count in IVD patients and between RF serum levels and hematocrit value in IVD patients, yet the tendency was increasing RF levels accompanied increasing hematocrit value.

Keywords: *Dengue virus infection, hematocrit, platelet, rheumatoid factor*

Korespondensi: Safari Wahyu J. Departemen Patologi Klinik Fakultas Kedokteran Universitas Muhammadiyah Surakarta, Kompleks Kampus IV UMS Gonilan Kartasura JIA. Yani Tromol Pos I Pabelan Kartasura Tel. (0271) 717417 Email: safari.wahyu@ums.ac.id

DOI: <http://dx.doi.org/10.21776/ub.jkb.2017.029.04.4>

PENDAHULUAN

Infeksi virus *dengue* (IVD) telah ditemukan di 125 negara anggota *World Health Organization* (WHO) (1). Kebanyakan negara yang terjangkit IVD berada di daerah tropis dan sub tropis dengan jumlah penderita mencapai 200 juta per tahun dan lebih dari 500 ribu orang berkembang menjadi IVD berat. Kematian akibat IVD dilaporkan 20 ribu orang per tahun (2).

Hemokonsentrasi dan trombositopenia biasa terjadi pada IVD. Mekanisme terjadinya hemokonsentrasi dan trombositopenia pada IVD adalah kompleks dan belum sepenuhnya diketahui dengan baik (3). Berbagai teori dikemukakan untuk menjawab masalah ini termasuk teori autoimunitas (4). Teori ini muncul karena adanya fakta bahwa pasien dengan IVD bisa berkembang menjadi penyakit autoimun (5), terjadinya reaksi autoimun sementara pada pasien IVD (6), ditemukannya autoantibodi terhadap trombosit dan endotel (7), dan membaiknya trombositopenia pada IVD dengan pemberian anti D antibodi yang selama ini diketahui menghambat pembentukan kompleks antara antigen platelet dengan autoantibodi antiplatelet pada pasien ITP (8).

Rheumatoid factor (RF) ditemukan pada sebagian besar penyakit autoimun. Peningkatan RF tidak hanya terjadi pada pasien dengan penyakit autoimun saja akan tetapi juga pada pasien infeksi (9). Terdapat publikasi yang menyebutkan bahwa RF ditemukan pada darah penderita IVD (10,11).

Hubungan antara kadar RF dengan jumlah trombosit dan nilai hematokrit pada IVD belum diketahui. Pernyataan ini didukung dengan fakta bahwa RF yang positif tidak selalu berkaitan dengan beratnya penyakit (12). Berdasarkan hal tersebut, maka diperlukan suatu penelitian untuk mengetahui hubungan antara RF dengan jumlah trombosit dan nilai hematokrit pada pasien IVD. Apabila hubungan kadar RF dengan jumlah trombosit dan nilai hematokrit dapat dibuktikan maka hal ini akan semakin memperkuat adanya reaksi autoimun pada pasien IVD. Kondisi ini memungkinkan IVD dikelompokkan sebagai penyakit autoimun.

Mengingat bahwa pembentukan trombosit dan eritrosit serta respon imun humoral dan seluler dipengaruhi oleh hormon kelamin (13,14), penelitian ini dilakukan pada pasien anak di bawah usia 14 tahun dan belum menstruasi. Batasan usia 14 tahun diambil karena rata-rata *menarche* anak perempuan mulai terjadi pada usia ini, namun anak perempuan di bawah 14 tahun yang sudah menstruasi tidak diikuti dalam penelitian (15). Peneliti juga membatasi penelitian pada pasien IVD dengan demam yang telah berlangsung minimal 4 hari karena penurunan trombosit biasa terjadi setelah hari ketiga (16).

METODE

Jenis penelitian ini adalah analitik korelatif dengan pendekatan potong lintang (17). Alasan pemilihan desain penelitian adalah perjalanan penyakit IVD yang tidak lama dan penelitian ini merupakan penelitian awal mengenai hubungan antara IgM RF dengan jumlah trombosit dan hematokrit mengingat belum pernah ada penelitian sebelumnya. Penelitian dilakukan di Bangsal Rawat Inap Penyakit Anak RSUD Surakarta Jawa Tengah. Pemeriksaan RF, hitung trombosit, dan pemeriksaan hematokrit dilakukan di laboratorium RSUD Surakarta.

Laporan penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa kejadian IVD tidak selalu berkaitan dengan musim, namun lebih terkait dengan suhu lingkungan (17,18). Berdasarkan kedua hal tersebut serta meratanya kejadian IVD sepanjang tahun di RSUD Surakarta, maka penelitian dilakukan pada bulan Agustus-Nopember 2016.

Besar sampel dihitung dengan menggunakan rumus besar sampel untuk penelitian analitik korelatif. Berdasarkan perhitungan didapatkan bahwa besar sampel sebanyak 39 orang (20). Sampel diambil dengan cara *consecutive sampling* karena ketiadaan *sampling frame*. Selain itu *consecutive sampling* merupakan cara pengambilan sampel *non probability* yang dianggap mendekati *probability sampling* (20). Kriteria inklusi dan eksklusi ditetapkan untuk menghindari bias. Adapun kriteria inklusi adalah laki-laki dan perempuan dengan usia <14 tahun dan belum menstruasi untuk perempuan, demam telah berlangsung minimal 4 hari dengan kriteria diagnostik dan rawat inap dengue sesuai dengan kriteria WHO 2009, dan terkonfirmasi dengan pemeriksaan IgG *antidengue* (+) maupun IgM dan IgG *antidengue* (+). Pasien dengan riwayat penderita ITP, riwayat penyakit autoimun, dan riwayat *immunocompromised* dikeluarkan dari penelitian.

Antibodi *antidengue* diperiksa dengan *Rapid Test* dari *Mono Dengue IgM/IgG Tri Line Test*. Secara ringkas proses pemeriksaan dapat dijelaskan sebagai berikut. Sampel dan komponen kit di bawa ke suhu ruangan kemudian 10 µL sampel serum diteteskan pada bagian Kit yang bertanda "S". Selanjutnya 3-4 tetes diluen dimasukkan ke dalam lubang bulat pada Kit lalu hasil dibaca dan diinterpretasikan dalam waktu 15-20 menit.

Rheumatoid factors diukur dengan tes aglutinasi lateks menggunakan *Latex Serology Test* (Avitex). Secara ringkas proses pemeriksaan dapat dijelaskan sebagai berikut. Dilakukan pengenceran serum mulai dari 1:2 hingga 1:64 dengan *isotonic saline* lalu sampel dan reagen di bawa ke dalam suhu ruangan. Selanjutnya 50µL sampel diteteskan pada *slide*. Reagen lateks dikocok lalu diteteskan 1 tetes di samping tetesan sampel. Reagen dan sampel kemudian dicampur dan diratakan sampai memenuhi lingkaran tes lalu diputar selama 2 menit dan dilihat adanya aglutinasi. Kadar RF didapatkan dengan pengenceran tertinggi yang memberikan hasil positif diperhitungkan dengan rumus: pengenceran tertinggi x sensitivitas reagen (8,0IU/ml).

Parameter hematologi diperiksa menggunakan alat *hematology analyzer* (Sysmex) dan diukur bersamaan dengan pemeriksaan kadar RF. Proses pemeriksaan dapat dijelaskan sebagai berikut: darah yang telah dicampur secara baik dengan EDTA dibiarkan selama 10-15 menit, kemudian darah EDTA campur ulang menggunakan mixer selama 10-15 menit. Selanjutnya sampel darah dihisap melalui *aspiration needle* dengan menekan tombol *start*. Setelah mengikuti petunjuk yang ada pada layar menu, maka hasil akan muncul pada layar Sysmex.

Data primer didapat dari hasil pemeriksaan sampel darah vena. Data sekunder didapat dari rekam medis Bagian Penyakit Anak RSUD Surakarta. Data yang terkumpul dinilai normalitas distribusinya menggunakan uji Saphiro-Wilk. Hipotesis diuji dengan menggunakan uji Spearman.

Penelitian telah mendapatkan izin penelitian dari Komisi Etik Penelitian Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Muhammadiyah Surakarta dengan nomor 295/B.1/KEPK-FKUMS/VI/2016. Semua subjek penelitian dimintakan

persetujuan melalui orang tua/wali dengan menanda tangani *informed consent*.

HASIL

Selama 2 bulan penelitian (Agustus- September 2016) didapatkan 52 pasien yang memenuhi kriteria IVD menurut WHO 2009. Berdasarkan kriteria inklusi dan eksklusi maka didapatkan 40 pasien yang memenuhi kriteria dan diikuti dalam penelitian. Pada penelitian ini didapatkan jumlah pasien laki-laki dan perempuan masing-masing 20 orang (50%) dan ditemukan bahwa sebanyak 25 pasien (62,5%) dengan RF positif. Karakteristik dari subjek penelitian disajikan pada Tabel 1.

Tabel 1. Karakteristik pasien

| Karakteristik | n | Rerata (simpangan baku) | Median (minimum- maksimum) |
|----------------------------------|----|-------------------------------|----------------------------------|
| Umur (tahun) | 40 | - | 8,5 (0,3-13) |
| Hemoglobin (g/dl) | 40 | 12,69 (1,78) | - |
| Leukosit ($10^3/\text{mm}^3$) | 40 | 5,16 (2,7) | - |
| Eritrosit ($10^6/\text{mm}^3$) | 40 | - | 4,76 (3,91-6,34) |
| Trombosit ($10^3/\text{mm}^3$) | 40 | 56,43 (26,31) | - |
| Hematokrit (%) | 40 | - | 36,5 (30-55) |
| Kadar RF (IU/ml) | 40 | - | 8 (0-64) |

Hasil uji *Spearman Rank Correlation Coefficient* kadar RF terhadap jumlah trombosit menunjukkan $r = 0,151$ dengan nilai $p=0,354$ (Tabel 2) sedangkan hasil uji korelasi kadar RF terhadap nilai hematokrit menunjukkan nilai $r = 0,3$ dengan nilai $p=0,06$. Hasil ini menunjukkan bahwa terdapat korelasi sangat lemah dan tidak bermakna antara kadar RF serum dengan jumlah trombosit dan terdapat korelasi lemah dan tidak signifikan antara kadar RF dengan nilai hematokrit.

Tabel 2. Hasil uji korelasi kadar RF terhadap jumlah trombosit dan hematokrit

| | | Jumlah Trombosit | Hematokrit |
|----------|---|------------------|------------|
| Kadar RF | r | 0,151 | 0,3 |
| | p | 0,354 | 0,06 |
| | n | 40 | 40 |

DISKUSI

Hasil memperlihatkan jumlah trombosit pasien IVD 56,43 (26,31) $10^3/\text{mm}^3$. Hal ini sejalan dengan penelitian terdahulu yang menunjukkan terjadinya trombositopenia pada pasien IVD. Trombositopenia merupakan kelainan darah yang konsisten terjadi pada IVD dan menjadi salah satu kriteria diagnostik IVD (21).

Pemeriksaan hematokrit pada penelitian ini didapatkan hasil 36,5% (30-55%). Hasil ini tidak berbeda dengan laporan penelitian Kamuh *et al* (22). Kenaikan nilai hematokrit lebih dari 20% biasa terjadi pada pasien IVD (23), namun pada penelitian ini tidak bisa diketahui persentase kenaikan nilai hematokrit. Desain penelitian

cross sectional menyebabkan kesulitan dalam menentukan apakah pasien mengalami peningkatan nilai hematokrit, akan tetapi nilai hematokrit 36,3% merupakan nilai *cut off point* untuk menunjang diagnosis IVD dengan kebocoran vaskuler (24).

Penelitian ini mengonfirmasi penelitian sebelumnya yang menyatakan bahwa RF ditemukan pada pasien dengan infeksi virus dan pasien IVD (25). Proporsi RF positif pada penelitian kami adalah 62,5%. Hal ini berbeda dengan laporan penelitian Garcia yang menyatakan bahwa proporsi RF positif adalah 3,8% (11). Hasil ini juga tidak sejalan dengan publikasi Ingegnoli *et al* yang menyatakan bahwa proporsi RF positif adalah 10% (10). Perbedaan ini mungkin disebabkan karena beberapa diantaranya perbedaan angka rujukan yang dipakai untuk menetapkan RF (+). Angka rujukan pada penelitian ini adalah 8 IU/ml dan ini lebih rendah dari penelitian sebelumnya, sehingga menjadikan banyak pasien yang terhitung sebagai RF (+). Angka rujukan 8IU/ml diambil dari petunjuk pemakaian yang dikeluarkan oleh produsen reagen latex dan fakta bahwa angka RF pada pasien infeksi virus tidak tinggi (11). Berbagai faktor seperti kebiasaan merokok dan minum kopi juga mempengaruhi pembentukan RF karena sel B penghasil RF ditemukan pada setiap orang (26). Zat yang terkandung di dalam kopi merangsang pembentukan RF sedangkan merokok diketahui merusak jaringan dan meningkatkan ekspresi FAS. Kerusakan jaringan memunculkan terpaparnya autoantigen kepada sistem imun. Respon imun terhadap autoantigen memicu terbentuknya autoantibodi termasuk di dalamnya RF (27,28). Penelitian ini berlokasi di Surakarta yang lebih dari 50% penduduknya adalah perokok (29). Paparan asap rokok pada anak bisa jadi merupakan penyebab tingginya RF (+) pada penelitian ini. Penggunaan pasien infeksi sekunder mempengaruhi produksi RF karena produksi RF dipicu oleh perangsangan berulang kompleks imun (30).

Hasil uji *Spearman rank correlation* koefisien hasil uji menunjukkan bahwa tidak ada korelasi yang bermakna antara kadar RF serum dengan jumlah trombosit dan nilai hematokrit. Beberapa alasan berikut dapat menjelaskan tidak adanya korelasi antar variabel pada penelitian ini. Penyebab pertama tidak adanya korelasi pada penelitian ini adalah secara teori IgM RF segera membentuk kompleks imun. Kompleks imun yang terjadi menyebabkan hasil pemeriksaan IgM RF konsisten rendah. Hal ini menyebabkan variabilitas nilai kadar RF serum tidak banyak. Secara statistik, hasil pengukuran yang konsisten rendah cenderung menyebabkan tidak ada korelasi antar variabel. Analisis ini didasarkan pada kenyataan bahwa DENV dapat dikenali oleh sel B. Ikatan antara DENV dengan BCR mengirim *downstream signal* melalui jalur *mitogen-activated protein kinases* (MAPK) yakni dengan fosforilasi Erk, JNK, dan p38. Aktivasi sel B meningkatkan ekspresi CD81 yang berfungsi untuk membantu berkumpulnya kompleks CD21/CD19 dengan BCR. CD21 yang terdapat pada kompleks tersebut bisa mengenali komplemen yang telah teraktifkan oleh DENV. Satu sampai dua jam setelah terjadi ikatan DENV dengan BCR dan ikatan antara CD21 dengan komplemen akan terjadi aktivasi sel B dini yang ditandai dengan terekspresikannya CD69 (31-35). Aktivasi dini sel B ini menyebabkan terbentuknya sel plasma penghasil IgM RF dalam waktu 3 hari setelah infeksi, akan tetapi kadar puncak IgM RF serum diketahui terjadi pada hari ke-7. Ketidaksamaan antara terbentuknya sel plasma dengan peningkatan kadar IgM RF serum terjadi karena

IgM RF segera membentuk kompleks imun (10). Berdasarkan hal ini maka kadar IgM RF yang terukur pada penelitian belum mencerminkan kadar IgM RF yang sesungguhnya.

Penyebab kedua adalah peran sel Treg yang mengurangi efek kerusakan yang ditimbulkan oleh peningkatan kadar berbagai sitokin dalam darah (*cytokine storm*) dan menurunkan produksi RF. Analisis ini didasarkan pada fakta bahwa pada IVD dibentuk sel Treg yang bersifat immunosupresif. Kedua sel ini lebih banyak ditemukan pada IVD yang tidak berat dan pada infeksi sekunder dari serotipe yang sama (36). Sel Treg mempengaruhi hasil penelitian dengan cara mensekresikan TGF- β dan IL-10 yang bersifat anti inflamasi. TGF- β dan IL-10 mengurangi produksi IFN γ , TNF α , dan IL-6 oleh sel T dan monosit. Berkurangnya produksi sitokin-sitokin tersebut mengurangi terjadinya *cytokine storm* yang menjadi faktor penting dalam penurunan jumlah trombosit dan peningkatan nilai hematokrit akibat kebocoran vaskuler dan kerusakan endotel (37). TGF- β juga menekan proliferasi sel B1 dan mengurangi aktifitas sel B1, sehingga kadar RF yang terbentuk menjadi sedikit (38). Mekanisme lain yang mendasari efek regulasi sel Treg adalah kontak sel antara APC, sel Th, dan sel Treg serta bertambahnya rasio Treg/Th menurunkan aktifitas sel Th dan sel APC. Berkurangnya aktifitas kedua sel tersebut mengurangi produksi sitokin sehingga mengurangi *cytokine storm* (37). Proses pengurangan efek kerusakan dari sel Treg ini dibantu oleh sel monosit yang juga memproduksi TGF- β ketika terinfeksi oleh DENV (39).

Penyebab ketiga tidak adanya korelasi pada penelitian ini adalah faktor lingkungan yang mempengaruhi pembentukan RF. Paparan faktor lingkungan yang terjadi pada awal kehidupan mempengaruhi sistem imun jangka panjang (40). Pasien dengan status sosial rendah cenderung mempunyai kadar IgM RF yang rendah (41). Mekanisme yang mendasari hal ini adalah pasien dengan status sosial rendah biasa hidup dengan sanitasi dan higiene yang kurang sehingga lebih sering terkena infeksi.

Respon imun terhadap infeksi memerlukan regulasi setelah patogen hilang dengan cara membentuk sel Treg. Interleukin 10 dan TGF- β yang dihasilkan oleh sel Treg menekan pembentukan IgM RF. Proses ini sering disebut sebagai *bystander suppression* (42).

Penyebab keempat adalah terdapat kemungkinan bahwa selain IgM RF juga terdapat IgG RF yang mempunyai peran pada perubahan jumlah trombosit dan nilai hematokrit. IgG RF tidak terdeteksi dengan metode pemeriksaan pada penelitian kami yang hanya bisa memeriksa IgM RF. Hal ini memberi pengaruh dalam terjadinya hasil penelitian yang menunjukkan tidak ada korelasi antara kadar RF serum dengan jumlah trombosit dan nilai hematokrit. Analisis ini didasarkan pada fakta bahwa sel B1 mampu memproduksi IgG dan IgA RF melalui mekanisme *immunoglobulin class switching* (ICS) (43,44). Hasil penelitian kami senada dengan penelitian Ursum *et al* (2010) yang menyimpulkan bahwa kadar RF serum tidak berkorelasi dengan beratnya penyakit (12).

Penelitian yang dilakukan ini masih mengandung keterbatasan. Pemeriksaan laboratorium hanya dilakukan satu kali sehingga tidak diketahui seberapa berat hemokonsentrasi yang terjadi, tidak membedakan serotipe DENV, dan tidak membedakan antara IVD berat dengan tidak berat.

Penelitian ini menunjukkan bahwa proporsi RF (+) pada pasien anak yang terinfeksi virus dengue sebesar 62,5% dan tidak berkorelasi dengan perubahan jumlah trombosit dan nilai hematokrit pada anak IVD, meskipun ada kecenderungan peningkatan kadar RF serum diikuti dengan kenaikan nilai hematokrit. Beberapa faktor diduga menjadi penyebab tidak adanya korelasi tersebut, antara lain IgM RF yang segera membentuk kompleks imun dengan DENV sehingga tidak terdeteksi oleh pemeriksaan RF, sel Treg yang menekan inflamasi, faktor lingkungan yang menekan pembentukan RF, dan adanya RF selain IgM yang tidak terukur dengan pemeriksaan IgM RF.

DAFTAR PUSTAKA

1. Ferreira GL. *Global Dengue Epidemiology Trends*. Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo. 2012; 54(S18): S5-6.
2. Murray NEA, Quam MB, and Wilder-Smith A. *Epidemiology of Dengue: Past, Present and Future Prospects*. Clinical Epidemiology. 2013; 5: 299–309
3. de Azeredo EL, Monteiro RQ, and Pinto LMO. *Thrombocytopenia in Dengue: Interrelationship between Virus and the Imbalance between Coagulation and Fibrinolysis and Inflammatory Mediators*. Mediators of Inflammation. 2015; 2015: 16.
4. Wan SW, Lin CF, Yeh TM, *et al*. *Autoimmunity in Dengue Pathogenesis*. Journal of the Formosan Medical Association. 2013; 112(1): 3-11.
5. Rajadhyaksha A and Mehra S. *Dengue Fever Evolving Into Systemic Lupus Erythematosus and Lupus Nephritis: A Case Report*. Lupus. 2012; 21(9): 999-1002.
6. Morel Z and Ramirez A. *Autoimmune Response in Children With Dengue. Case Reports*. Reumatologia Clinica. 2014; 10(4): 257–259.
7. Huang KJ, Lin YS, Liu HS, Yeh TM, Liu CC, and Lei HY. *Generation of Anti-platelet Autoantibody During Dengue Virus Infection*. American Journal of Infectious Diseases. 2008; 4(1): 50-59.
8. de Castro RA, de Castro JA, Barez MY, Frias MV, Dixit J, and Genereux M. *Thrombocytopenia Associated with Dengue Hemorrhagic Fever Responds to Intravenous Administration of Anti-D (Rh0-D) Immune Globulin*. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. 2007; 76(4): 737–742.
9. Woods CR. *False-Positive Results for Immunoglobulin M Serologic Results: Explanations and Examples*. Journal of the Pediatric Infectious Diseases Society. 2013; 2(1): 87-90.
10. Ingegnoli F, Castelli R, and Gualtierotti R. *Rheumatoid Factors: Clinical Applications*. Disease Markers. 2013; 35(6): 727–734.
11. Garcí'a G, Gonzalez N, Perez AB, *et al*. *Long-Term Persistence of Clinical Symptoms in Dengue-Infected Persons and Its Association with Immunological Disorders*. Internationale Journal of Infectious Disease. 2011; 15(1): e38-43.
12. Ursum J, Bos WH, van Dillen N, Dijkmans BA, and van

- Schaardenburg D. *Level of Anti-Citrullinated Protein Antibodies and IgM Rheumatoid Factor are not Associated with Outcome in Early Arthritis Patients: A Cohort Study*. *Arthritis Research & Therapy*. 2010; 12(1): R8.
13. Murphy WG. *The Sex Difference in Haemoglobin Levels in Adults - Mechanisms, Causes, and Consequences*. *Blood Reviews*. 2014; 28(2): 41-47.
 14. Nguyen PV, Kafka JK, Ferreira VH, Roth k, and Kaushic C. *Innate and Adaptive Immune Responses in Male and Female Reproductive Tracts in Homeostasis and Following HIV Infection*. *Cellular & Molecular Immunology*. 2014; 11(5): 410-427.
 15. Ameade EPK and Garti HA. *Age at Menarche and Factors that Influence It: A Study among Female University Students in Tamale, Northern Ghana*. *PLoS ONE*. 2016; 11(5): e0155310.
 16. Khan DM, Kuppusamy K, Sumathi S, and Mrinalini VR. *Evaluation of Thrombocytopenia in Dengue Infection Along with Seasonal Variation- Rural Melmaruvathur*. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*. 2014; 8(1): 39-42.
 17. Ghazali MV, Sastrimohardjo, Soedjarwo SR, Soelaryo T, dan Pramulyo HS. *Studi Cross-Sectional*. Di dalam: Sastroasmoro S dan Ismael S (eds). *Dasar-dasar Metodologi Penelitian Edisi ke-5*. Jakarta; Sagung Seto: p. 130.
 18. Arcari P, Tapper N, and Pfueller S. *Regional Variability in Relationships between Climate and Dengue/DHF in Indonesia*. *Singapore Journal of Tropical Geography*. 2007; 28(3): 251-272.
 19. Morin CW, Comrie AC, and Ernst KC. *Climate and Dengue Transmission: Evidence and Implications*. *Environmental Health Perspectives*. 2013; 121(11-12): 1264-1272.
 20. Dahlan MS. *Besar Sampel dan Cara Pengambilan Sampel dalam Penelitian Kedokteran dan Kesehatan*. Cetakan kedua. Jakarta: Salemba Medika; 2013; hal. 137-146.
 21. Bashir AB, Mohammed BA, Saeed OK, and Ageep AK. *Thrombocytopenia and Bleeding Manifestation among Patient with Dengue Virus Infection in Port Sudan, Red Sea State of Sudan*. *Journal of Infectious Disease and Immunity*. 2015; 7(2): 7-13.
 22. Kamuh SSP, Mongan AE, dan Memah MF. *Gambaran Nilai Hematokrit dan Laju Endap Darah pada Anak dengan Infeksi Virus Dengue di Manado*. *Jurnal eBiomedik*. 2015; 3(3): 738-742.
 23. Michels M, Sumardi U, de Mast Q, et al. *The Predictive Diagnostic Value of Serial Daily Bedside Ultrasonography for Severe Dengue in Indonesian Adults*. *PLoS Neglected Tropical Disease*, 2013; 7(6): e2277.
 24. Wakimoto MD, Camacho LAB, Guaraldo L, Damasceno LS, and Brasil P. *Dengue in Children: A Systematic Review of Clinical and Laboratory Factors Associated with Severity*. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*. 2015; 13(12): 1441-1456.
 25. Too CL, Rönnelid J, Yusoff YM, et al. *Increased IgG Rheumatoid Factor-Positivity in the Asian Rheumatoid Arthritis Patients Irrespective of Ethnicity*. *Open Journal of Rheumatology and Autoimmune Diseases*. 2014; 4(1): 43-51.
 26. van Beers-Tas MHa, Turk SA, and van Schaardenburg D. *How Does Established Rheumatoid Arthritis Develop, and are There Possibilities for Prevention?* *Best Practice & Research. Clinical Rheumatology*. 2015; 29(4-5): 527-542.
 27. Nielsen SF, Bojesen SE, Schnohr P, and Nordestgaard BG. *Elevated Rheumatoid Factor and Long Term Risk of Rheumatoid Arthritis: A Prospective Cohort Study*. *British Medical Journal*. 2012; 345: e5244.
 28. Harel-Meir M, Sherer Y, and Shoenfeld Y. *Tobacco Smoking and Autoimmune Rheumatic Diseases*. *Nature Clinical Practice Rheumatology*. 2007; 3(12): 707-715.
 29. Dinas Kesehatan Kota Surakarta. *Profil Kesehatan Kota Surakarta Tahun 2012*. Edisi 1. Surakarta: Depkes Surakarta; 2013: hal. 56.
 30. Goins CL, Chappell CP, Shashidharamurthy R, Selvaraj P, and Jacob J. *Immune Complex-Mediated Enhancement of Secondary Antibody Responses*. *The Journal of Immunology*. 2010; 184(11): 6293-6298.
 31. Correa ARV, Berbel ACER, Papa MP, de Morais ATS, Peçanha LMT, and de Arruda LB. *Dengue Virus Directly Stimulates Polyclonal B Cell Activation*. *PLoS ONE*. 2015; 10(12): e0143391.
 32. Mathew A, West K, Kalayanaraj S, et al. *B-Cell Responses During Primary and Secondary Dengue Virus Infections in Humans*. *The Journal of Infectious Diseases*. 2011; 204(10): 1514-1522.
 33. de Franco AL. *B Lymphocyte Signaling Mechanisms and Activation*. In: Paul WE (Ed). *Fundamental Immunology* 6th edition. Philadelphia: Wolter Kluwer Health; 2008: pp. 270-286.
 34. Vences-Catalan F, Rajapaksa R, Levy S, and Santos-Argumedo L. *The CD19/CD81 Complex Physically Interacts with CD38 but Is Not Required to Induce Proliferation in Mouse B Lymphocytes*. *Immunology*. 2012; 137(1): 48-55.
 35. Borges O, Borchard G, de Sousa A, Junginger HE, and Cordeiro-da-Silva A. *Induction of Lymphocytes Activated Marker CD69 Following Exposure to Chitosan and Alginate Biopolymers*. *International Journal of Pharmaceutics*. 2007; 337(1-2): 254-264.
 36. Jayaratne HE, Wickramasinghe N, Adikari TN, et al. *Expansion of Regulatory T Cells in Acute Dengue Infection Does Not Associate with Disease Severity*. *International Journal of Infectious Disease*. 2016; 45(1): 439-477.
 37. Luhn K, Simmons CP, Moran E, et al. *Increased Frequencies of CD4⁺CD25^{high} Regulatory T Cells in Acute Dengue Infection*. *Journal of Experimental Medicine*. 2007; 204(5): 979-985.
 38. Xu A, Liu Y, Chen W, et al. *TGF- β -Induced Regulatory T Cells Directly Suppress B Cell Responses Through a Non-Cytotoxic Mechanism*. *The Journal of Immunology*, 2016, 196(9): 3631-3641.
 39. Supriatna M, Tondy H, Ermin T, Istanti Y, dan Kisdjamiatun RMD. *Korelasi Antara Transforming*

- Growth Factor-B1 Monosit dengan Kebocoran Vaskuler pada Demam Berdarah Dengue.* Jurnal Kedokteran Brawijaya. 2010; 26(1): 20-23.
40. Edward CJ. *Can the Events of Early Life Influence the Development of Rheumatoid Arthritis?* The Journal of Rheumatology. 2010; 37(1): 1-2.
 41. Ruiz-Esquide V and Sanmartí R. *Tobacco and Other Environmental Risk Factors in Rheumatoid Arthritis.* Reumatologia Clinica. 2012; 8(6): 342-350.
 42. Hartmann W, Schramm C, and Breloer M. *Litomosoides sigmodontis induces TGF- β receptor responsive, IL-10-producing T cells that suppress bystander T-cell proliferation in mice.* European Journal of Immunology, 2015; 45(9): 2568-2581.
 43. Balakrishnan T, Bela-Ong DB, Toh YX, et al. *Dengue Virus Activates Polyreactive, Natural IgG B Cells After Primary and Secondary Infection.* PLoS ONE. 2011; 6(12): e29430.
 44. Stavnezer J and Kang J. *The Surprising Discovery that TGF β Specifically Induces the IgA Class Switch.* The Journal of Immunology. 2009; 182(1): 5-7.