

## Perbedaan Ekspresi Caspase 3 pada Limpa Tikus Model Sepsis yang Diinfeksi *Escherichia coli* ESBL dan dengan yang Diinfeksi *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase

Lisa Savitri <sup>1)</sup>, Willy Sandhika <sup>2)</sup>, Agung Dwi Wahyu Widodo <sup>3)</sup>

<sup>1)</sup> *Analisis Kesehatan, Universitas Kadiri*

<sup>2)</sup> *Departemen Patologi Anatomi, FK, Universitas Airlangga*

<sup>3)</sup> *Departemen Mikrobiologi, RSUD Dr. Soetomo Surabaya*

*Jl. Selomangleng no. 1 Kediri*

*Email : lisasavitri@unik-kediri.ac.id*

**Abstrak .** Sepsis adalah suatu sindroma klinik yang terjadi karena adanya respon tubuh yang berlebihan terhadap rangsangan produk mikroorganisme. Pasien sepsis dengan infeksi bakteri penghasil ESBL 57,4% terinfeksi *E. coli*, 21,35% terinfeksi *Enterobacter sp*, dan 21,3% terinfeksi *Klebsiella sp*. Sepsis dapat diperberat oleh peningkatan kuman yang multiresisten terhadap bermacam antibiotik, seperti *E. coli* ESBL dan *K. pneumoniae carbapenemase* (KPC). Selama infeksi bakteri, faktor virulen diproduksi dan disekresikan dari patogen dan memicu sinyal apoptosis. Penelitian mengenai caspase 3 dianggap penting, karena caspase 3 merupakan efektor caspase terpenting yang bertanggungjawab atas morfologi dan perubahan biologis yang terlihat pada sel apoptosis. Jenis penelitian ini adalah true experimental dengan rancangan penelitian post test only control group design. Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekspresi caspase 3 pada limpa mencit yang diinfeksi KPC adalah  $65,25 \pm 12,69\%$ , sedangkan yang diinfeksi *E. coli* ESBL adalah  $33,75 \pm 3,862\%$ , hal tersebut diduga karena adanya kapsul polisakarida yang mengelilingi KPC dan melindungi dirinya terhadap aksi fagositosis dan bakterisidal serum yang dapat dianggap sebagai penentu virulensi paling penting dari KPC dan menyebabkan mitokondria melepaskan ROS. Infeksi bakteri tersebut menyebabkan mitokondria memproduksi ROS dan memicu pelepasan sitokrom c. Sitokrom c akan memicu caspase 9 untuk berikatan dengan efektor caspase 3, sehingga terjadi apoptosis

**Katakunci:** Sepsis, ekspresi caspase 3, limpa tikus, *Escherichia coli* ESBL, *Klebsiella pneumoniae carbapenemase*

### 1. Pendahuluan

Sepsis adalah keadaan darurat medis yang menggambarkan respons imunologis sistemik tubuh terhadap proses infeksi yang dapat menyebabkan disfungsi organ stadium akhir dan kematian. Meskipun ada kemajuan yang signifikan dalam pemahaman patofisiologi sindrom klinis ini, kemajuan dalam alat pemantauan hemodinamik, dan tindakan resusitasi, sepsis tetap menjadi salah satu penyebab utama morbiditas dan mortalitas pada pasien yang sakit kritis [1]. Insiden tahunan sepsis berat dan syok septik di Amerika Serikat hingga 300 kasus per 100.000 orang. Sepsis juga merupakan masalah perawatan kesehatan paling mahal di Amerika Serikat, terhitung lebih dari \$ 20 juta (sekitar 5,2% dari total biaya rumah sakit) pada tahun 2011 saja [2]. Sepsis memiliki tingkat kejadian yang tinggi, hal tersebut didukung oleh penelitian mengenai tingkat penyebaran sepsis di ICU RSUP Prof. Dr. R. D. Kandou Manado yang mendapatkan hasil bahwa terdapat 27,08% penderita sepsis berat, 14,58% penderita syok septik, dan 58,33% penderita sepsis [3].

Namun, beban epidemiologis global sepsis sulit untuk dipastikan. Diperkirakan lebih dari 30 juta orang terkena sepsis setiap tahun di seluruh dunia, yang berpotensi menyebabkan 6 juta kematian setiap tahun. Tingkat kematian akibat sepsis, sesuai dengan data dari *Surviving Sepsis Campaign* 2012, sekitar 41% di Eropa dibandingkan sekitar 28,3% di Amerika Serikat [4]. Namun perbedaan ini menghilang ketika disesuaikan dengan tingkat keparahan penyakit [3]. Ini menyiratkan bahwa kematian dalam sepsis bervariasi sesuai dengan karakteristik pasien juga. Sebuah studi *multicenter* di

Australia dan Selandia Baru yang mencakup 101.064 pasien kritis menunjukkan bahwa angka kematian dalam sepsis telah menurun selama bertahun-tahun dari sekitar 35% pada 2000 menjadi sekitar 20% pada 2012 [1].

Sepsis merupakan masalah klinis yang penting meskipun telah terjadi kemajuan terapi. Sepsis dapat diperberat oleh peningkatan kuman yang multiresisten terhadap bermacam antibiotik, sehingga sangat diperlukan kombinasi antibiotik dalam penatalaksanaan sepsis. Spesies Enterobacteriaceae patogen pada manusia memiliki jumlah strain resisten antibiotik yang banyak dan telah terdeteksi di seluruh dunia. Resistensi antibiotik yang paling banyak ditemui pada Enterobacteriaceae adalah beta-laktam, fluoroquinolones, aminoglikosida, dan baru-baru ini resistensi terhadap polymyxins juga telah ditemukan. Resistensi beta-laktam adalah resistensi yang disebabkan oleh bakteri yang memiliki beta-laktamase, sehingga mampu menghidrolisis antibiotik beta-laktam. Beta-laktamase yang paling penting adalah sefalosporinase, misalnya *Extended Spectrum Beta-Lactamases* (ESBLs) dan carbapenemases, misalnya *Metallo-Beta-Laktamases* (MBLs), *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases (KPCs), dan enzim oxacillinase Oxa-48 [5]. Berdasarkan penelitian yang dilakukan di RSUP Dr. Kariadi Semarang, diketahui bahwa dari 141 pasien sepsis dengan infeksi oleh bakteri penghasil ESBL diantaranya 57,4% terinfeksi *Escherichia coli*, 21,35% terinfeksi *Enterobacter* sp, dan 21,3% terinfeksi *Klebsiella* sp [6]. *E. coli* yang memiliki resistensi terhadap beta-laktam dinamakan dengan *E. coli* ESBL, sedangkan *K. pneumoniae* yang memiliki resistensi terhadap carbapenem dinamakan dengan *K. pneumoniae* carbapenemase. Selain memiliki enzim-enzim yang membuatnya resisten terhadap antibiotik tertentu, *E. coli* ESBL dan *K. pneumoniae* carbapenemase memiliki endotoksin berupa lipopolisakarida (LPS).

Telah ada evolusi yang nyata dalam pemahaman tentang patobiologi molekuler dan imunologi sepsis. Sebelumnya diketahui bahwa manifestasi hemodinamik dari sepsis terutama terkait dengan respon *host* hiperimun terhadap patogen tertentu [7] Namun, banyak penelitian yang bekerja pada dasar molekuler sepsis telah mengungkapkan interaksi yang jauh lebih kompleks antara agen infeksi dan *host* yang bersama-sama menghasilkan manifestasi sepsis yang heterogen [8]. Faktor kunci dalam kematian sel spesifik organ adalah apoptosis. Pemahaman yang jelas tentang efek translokasi bakteri terhadap memulai jalur apoptosis yang menginduksi *Multiple Organ Failure Dysfunction Syndrome* (MODS) sangat penting untuk mengembangkan modalitas pengobatan yang efektif. Translokasi tidak terjadi secara alami dan jalur apoptosis tetap tidak jelas [9].

Caspases adalah keluarga protease sistein yang memediasi kematian sel yang teregulasi, termasuk apoptosis dan piroptosis [10]. Caspase-3, -7, dan -6 berfungsi sebagai caspases efektor dalam apoptosis dan menginduksi eksternalisasi phosphatidylserine (PS), penyusutan sel, *blebbing* membran, dan fragmentasi DNA dengan membelah apa yang disebut *death substrate* [11,12]. Penelitian mengenai caspase 3 dianggap penting, karena caspase 3 merupakan efektor caspase terpenting yang bertanggungjawab atas morfologi dan perubahan biologis yang terlihat pada sel apoptosis [13], walaupun caspase -7 dan -6 merupakan efektor caspase, namun letak jalur caspase tersebut berada di awal, sehingga masih terdapat kemungkinan walaupun caspase tersebut teraktivasi, namun akhirnya apoptosis gagal terjadi dikarenakan rilisnya protein Bcl-2 antiapoptosis yang dapat menghambat apoptosis.

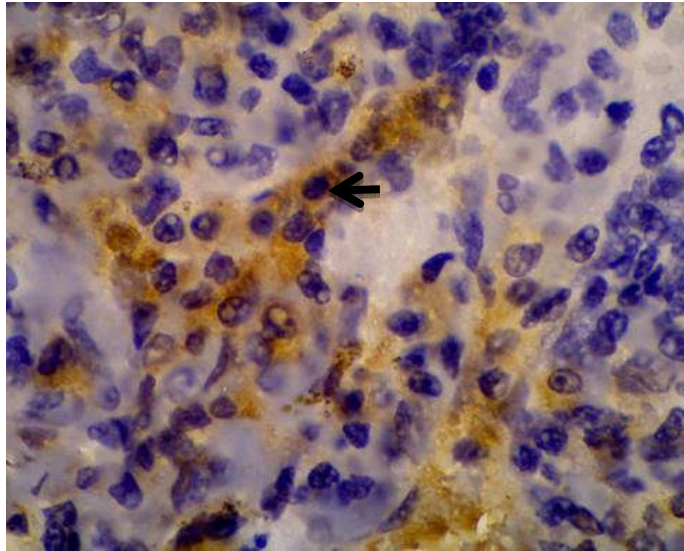
## 2. Pembahasan

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, didapatkan hasil bahwa ekspresi caspase 3 pada limpa tikus dengan infeksi *K. pneumoniae* carbapenemase lebih tinggi daripada infeksi *E. coli* ESBL. Berikut ini adalah data rerata dan simpangan baku ekspresi caspase 3 pada limpa tikus kelompok kontrol, tikus yang diinfeksi *E. coli* ESBL, dan tikus yang diinfeksi *K. pneumoniae* carbapenemase (Tabel 1).

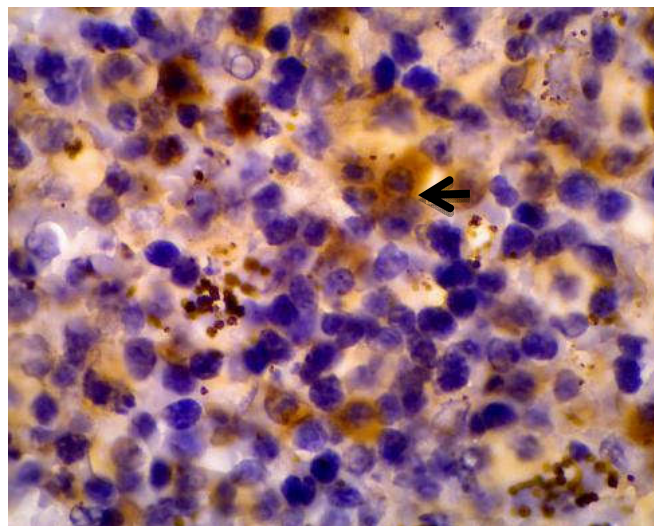
Tabel 1. Data Rerata dan Simpangan Baku Ekspresi Caspase 3 pada Limpa Tikus dengan Perlakuan Kontrol, Infeksi *Escherichia coli* ESBL, dan Infeksi *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (%)

Kelompok	$\bar{x} \pm SD$	Median	Max-Min
Kontrol (n=4)	4,25±0,5	4	5-4
<i>E. coli</i> ESBL (n=4)	33,75±3,862	33,5	38-30
<i>K. pneumoniae</i> carbapenemase (n=4)	65,25±12,69	67	78-49

Berdasarkan data pada Tabel 1, dapat diketahui bahwa ekspresi caspase 3 pada limpa kelompok tikus yang diinfeksi *K. pneumoniae* carbapenemase memiliki nilai yang paling tinggi, yaitu sebesar  $65,25 \pm 12,69\%$ , sedangkan ekspresi caspase 3 pada limpa tikus yang diinfeksi *E. coli* ESBL adalah sebesar  $33,75 \pm 3,862\%$ . Ekspresi caspase 3 pada limpa tikus yang diinfeksi *E. coli* ESBL dan *K. pneumoniae* carbapenemase dapat dilihat pada Gambar 1 dan 2.



Gambar 1. Ekspresi Caspase 3 Sel Limfosit pada Limpa Tikus yang Diinfeksi *Escherichia coli* ESBL dengan Perbesaran 1000x (sitoplasma sel berwarna cokelat seperti yang ditunjukkan dengan tanda panah)



Gambar 2. Ekspresi Caspase 3 Sel Limfosit pada Limpa Tikus yang Diinfeksi *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase dengan Perbesaran 1000x (sitoplasma sel berwarna cokelat seperti yang ditunjukkan dengan tanda panah)

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan, didapatkan bahwa peningkatan ekspresi caspase 3 terjadi secara signifikan antara kelompok tikus yang diinfeksi *E. coli* ESBL dan yang diinfeksi *K. pneumoniae* carbapenemase terhadap kelompok tikus kontrol. Fungsi dari limpa berpusat pada sirkulasi sistemik. Limpa memiliki dua kompartemen yang secara fungsional dan morfologis berbeda, yaitu pulpa merah dan pulpa putih. Pulpa merah adalah filter darah yang menghilangkan bahan asing dan eritrosit yang rusak, selain itu juga merupakan tempat penyimpanan untuk zat besi, eritrosit, dan trombosit. Limpa merupakan situs hematopoiesis pada tikus, terutama pada janin dan neonatal animals. Limpa juga merupakan organ limfoid terbesar yang mengandung sekitar seperempat dari limfosit dan memulai tanggapan kekebalan terhadap antigen yang ditularkan melalui darah [14].

*Bacterial translocation* (BT) adalah perjalanan mikroflora melalui lamina propria ke kelenjar getah bening mesenterika lokal (MLN) dan ke organ lain, seperti hati dan limpa. Translokasi tidak terjadi dalam kondisi normal. Dalam kondisi seperti terbakar, kelaparan, obstruksi usus, trauma bedah, anestesi, obstruksi kandung empedu, dan syok, translokasi bakteri merusak fungsi sawar usus dan struktur mukosa di saluran gastrointestinal (GI) [15]. Setelah translokasi, bakteri enterik masuk ke sirkulasi sistemik dan menyebar ke seluruh tubuh, yang dapat menyebabkan sepsis, syok, kegagalan multiorgan, dan kematian [16]. Kegagalan multiorgan adalah masalah utama karena kematian terkait. Kegagalan organ multipel seringkali disebabkan oleh MODS [17]. Apoptosis juga merupakan faktor penting dalam kematian sel spesifik organ dan kegagalan multiorgan. Dengan adanya translokasi bakteri, khususnya pada sepsis, retardasi dan keterlambatan apoptosis neutrofil memperburuk respon imun dan memperburuk kaskade yang menopang MODS [16].

Mikroorganisme translokasi yang paling umum adalah *E. coli* dan *Klebsiella* spp. Penanda apoptosis: caspase 3, 8, dan 9 diaktifkan di usus kecil dan MLN. Bakteri umumnya menginduksi apoptosis dengan sekresi inhibitor sintesis protein, produksi protein pori, dan aktivasi molekul, seperti *lipopolysaccharides* (LPS), atau antigen super lainnya [18]. LPS yang merupakan komponen dari dinding luar bakteri gram negatif seperti *E. coli* berikatan dengan LPS *binding protein* (LBP), protein fase akut terlarut, LPS yang bergabung dengan LPB dapat menginduksi ekspresi CD14, ligan penginduksi apoptosis terkait TNF dan TLR14, sehingga menstimulasi faktor transkripsi nuklir kappa B (NF- $\kappa$ B) yang menghasilkan pelepasan banyak jenis faktor inflamasi dan zat toksik seluler. Akibatnya, LPS merusak fungsi penghalang usus dengan mengaktifkan mediator kimia, yaitu eikosanoid, interleukin-1, interleukin-6, TNF $\alpha$ , superoksida, dan oksida nitrat. Gangguan penghalang usus menyebabkan kegagalan organ multipel.

Zat yang diturunkan dari patogen dengan sifat imunologis, seperti LPS, komponen dinding sel bakteri Gram-negatif, telah terbukti menginduksi kondisi sepsis seperti *in vivo*. LPS menginduksi produksi sitokin proinflamasi yang berlebihan, seperti TNF- $\alpha$  dan interleukin-6 (IL-6) yang menyebabkan cedera jaringan inflamasi dan apoptosis [19]. Shinozaki [20] menunjukkan bahwa penghambatan molekul proapoptosis caspase-3 dan ekspresi Bax dan Bim melemahkan disfungsi hati dan limpa yang diinduksi LPS dan mengurangi mortalitas. Selain itu, telah ditunjukkan bahwa inhibitor caspase dan penghambat reseptor kematian mencegah apoptosis limfosit dan meningkatkan kelangsungan hidup pada sepsis [21]. TNF- $\alpha$  dapat menginduksi apoptosis pada berbagai sel tetapi juga mengaktifkan jalur survival intraseluler spesifik melalui aktivasi NF- $\kappa$ B. NF- $\kappa$ B memiliki peran penting dalam peradangan dan regulasi imun, tetapi juga pengaktifannya memulai jalur survival intraseluler melalui regulasi anti-apoptosis Bcl-2, Bcl-XL, dan inhibitor apoptosis (IAP) ekspresi, seperti survivin [22].

Peningkatan ekspresi caspase 3 pada limpa tikus yang diinfeksi *K. pneumoniae* carbapenemase lebih tinggi jika dibandingkan dengan yang diinfeksi *E. coli* ESBL, hal tersebut dapat dipengaruhi karena adanya perbedaan antigen yang dimiliki oleh *K. pneumoniae* carbapenemase dengan *E. coli* ESBL. Kapsul *K. pneumoniae* carbapenemase terdiri dari antigen O yang merupakan

liposakarida yang terdiri atas unit polisakarida yang berulang. Polisakarida O-spesifik mengandung gula yang unik. Antigen O tahan terhadap panas dan alkohol. Antigen kedua adalah antigen K. Antigen K berada di luar antigen O dan merupakan suatu *capsular polysacharida*. Antigen K dapat mengganggu aglutinasi melalui antiserum O dan berhubungan dengan virulensi. Kedua antigen ini meningkatkan patogenitas *K. pneumoniae* carbapenemase.

Mekanisme yang mendasari di balik disfungsi jaringan dan organ dalam sepsis adalah penurunan pengiriman dan pemanfaatan oksigen oleh sel-sel sebagai akibat dari hipoperfusi. Hipoperfusi terjadi karena disfungsi kardiovaskular yang terlihat pada sepsis. Akibatnya, ada peningkatan glikolisis anaerob dalam sel yang menghasilkan produksi asam laktat. Selain itu, *reactive oxygen species* (ROS) yang dihasilkan oleh respon inflamasi menyebabkan disfungsi mitokondria dan penurunan kadar ATP. Mekanisme ini menyebabkan kerusakan pada tingkat sel. Perubahan yang lebih luas yang dijelaskan di bawah ini yang terjadi pada jaringan dan organ secara kolektif dan kumulatif berkontribusi banyak morbiditas dan mortalitas sepsis [24]. Ada perubahan signifikan pada endotelium dengan gangguan fungsi penghalang, vasodilatasi, peningkatan adhesi leukosit, dan pembentukan prokoagulan. Ini menghasilkan akumulasi cairan edema di ruang interstitial, rongga tubuh, dan jaringan subkutan. Sepsis diketahui menghasilkan keadaan katabolik. Ada kerusakan otot yang cepat dan signifikan untuk menghasilkan asam amino untuk glukoneogenesis yang akan memicu sel-sel kekebalan. Selain itu, peningkatan resistensi insulin dapat menyebabkan keadaan hiperglikemia.

*Activated caspase 3* adalah efektor sentral dari apoptosis yang memotong dan menonaktifkan sejumlah molekul yang berkontribusi terhadap morfologi khas apoptosis [25]. Peningkatan ekspresi gen caspase 3 telah dijelaskan dalam sel-sel di bawah apoptosis [26]. Dalam kasus ini, jelas bahwa setelah infeksi bakteri dan produksi ROS selanjutnya, tingkat mRNA caspase 3 meningkat untuk memenuhi meningkatnya permintaan untuk pelaksanaan apoptosis.

### 3. Simpulan

Terjadi peningkatan ekspresi caspase 3 pada limpa tikus yang diinfeksi *K. pneumoniae* carbapenemase yang lebih tinggi jika dibandingkan dengan yang diinfeksi *E. coli* ESBL, hal tersebut diduga dapat dipengaruhi karena adanya perbedaan antigen yang dimiliki oleh kedua bakteri tersebut, sehingga kemungkinan apoptosis yang terjadi pada sel limfosit yang disebabkan oleh *K. pneumoniae* carbapenemase akan lebih tinggi jika dibandingkan dengan yang diinfeksi *E. coli* ESBL.

### Ucapan Terima Kasih

Ucapan terimakasih disampaikan kepada Ibu Retno Sri Wulandari dan Bapak Joni Sumarsono yang telah memberikan dukungan moril dan materiil kepada penulis, terimakasih juga disampaikan kepada Universitas Airlangga dan RSUD Dr. Soetomo Surabaya yang telah menyediakan tempat untuk penelitian dan pengambilan data.

## Daftar Pustaka

- [1] Alexander JW, Boyce ST, Babcock GF, Gianotti L, Peck MD, Dunn DL, Pyles T, Childress CP, Ash SK. The process of microbial translocation. *Ann Surg* 1990; 212: 496-510.
- [2] Balogh P, Horváth G, Szakal AK. 2004. *Immunoarchitecture of distinct reticular fibroblastic domains in the white pulp of mouse spleen. J Histochem Cytochem.*, 52:1287-1298.
- [3] Chiang, L. W., Grenier, J. M., Ettwiller, L., Jenkins, L. P., Ficenc, D., Martin, J., Wood, A. (2001). *An orchestrated gene expression component of neuronal programmed cell death revealed by cDNA array analysis. Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(5), 2814-2819. <https://doi.org/10.1073/pnas.051630598>
- [4] Fischer, U., Jänicke, R., & Schulze-Osthoff, K. (2003). *Many cuts to ruin: a comprehensive update of caspase substrates. Cell death and differentiation*, 10(1), 76. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.cdd.4401160>
- [5] Galluzzi, L., et al. Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death Differ.* <https://doi.org/10.1038/s41418-017-0012-4>. (2018)
- [6] Ghatage DD, Gosavi SR, Ganvir SM, and Hazarey VK. 2013. Apoptosis: Molecular Mechanism. *Journal of Orofacial Sciences.*, 4: 103-107.
- [7] Grassme H, Jendrossek V, Gulbins E. Molecular mechanisms of bacteria induced apoptosis. *Apoptosis* 2001; 6: 441-445.
- [8] Gyawali, B., Ramakrishna, K., and Dhmoon. 2019. Sepsis: *The evolution in definition, pathophysiology, and management.* SAGE Open Med. 2019; 7: 2050312119835043. Published online 2019 Mar 21. doi: 10.1177/2050312119835043
- [9] Hattori, N., Eguchi, H., Hatano, T., Sato, F., Sato, S., Saiki, S., Kawajiri, S. 2010. PINK1 is recruited to mitochondria with parkin and associates with LC3 in mitophagy. *FEBS Letters* Volume584, Issue6, March 19, 2010, Pages 1073-1079. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2010.02.016>
- [10] Jones AE and Puskarich MA. Sepsis-induced tissue hypoperfusion. *Crit Care Nurs Clin North Am* 2011; 23(1): 115–125
- [11] Kaukonen K, Bailey M, Suzuki S, et al. 2014. *Mortality related to severe sepsis and septic shock among critically ill patients in Australia and New Zealand, 2000–2012.* *JAMA* 2014; 311(13): 1308–1316.
- [12] Kocsis B and Szabo D. 2013. *Antibiotic Resistance Mechanisms in Enterobacteriaceae. Formatex*, 251-257.
- [13] Levy MM, Artigas A, Phillips GS, et al. 2012. *Outcomes of the surviving sepsis campaign in intensive care units in the USA and Europe: a prospective cohort study.* *Lancet Infect Dis* 2012; 12(12): 919–924.
- [14] Louis K, Netea MG, Carrer DP, Kotsaki A, Mylona V, Pistiki A, Savva A, Roditis K, Alexis A, Van der Meer JW, Giamarellos-Bourboulis EJ. Bacterial translocation in an experimental model of multiple organ dysfunctions. *J Surg Res*, 2013; 183: 686-94.
- [15] Mete, E., Cevahir, N., Oguz, E.O., Sahin, B., Kaleli, I., Ozdemir, M.B., Koseler, A., and Mete, G.A. 2017. *Bacteria induced extrinsic and intrinsic apoptotic pathways in the rat gastrointestinal system.* *Biomedical Research* 2017; 28 (4): 1670-1676
- [16] Nagata, S. & Tanaka, M. Programmed cell death and the immune system. *Nat. Rev. Immunol.* 17, 333–340 (2017).
- [17] Pajariu A, Firmanti SC, & Isbandrio B. 2010. *Infeksi oleh Bakteri Penghasil Extended-Spectrum-Beta-Lactamase (ESBL) di RSUP Dr. Kariadi Semarang: Faktor Risiko Terkait*

- Penggunaan Antibiotik*. Program Pendidikan Sarjana Kedokteran Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro.
- [18] Shalini, S., Dorstyn, L., Dawar, S. & Kumar, S. Old, new and emerging functions of caspases. *Cell Death Differ*. 22, 526–539 (2015).
- [19] Shinozaki, F., Tomizawa, M., Sugiyama, T., Yamamoto, S., Sueishi, M., and Yoshida, T. 2010. *Sorafenib suppresses the cell cycle and induces the apoptosis of hepatocellular carcinoma cell lines in serum-free media*. *Experimental and Therapeutic Medicine* September 2010, Volume 1 Issue 5. <https://doi.org/10.3892/etm.2010.131>
- [20] Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, et al. The third international consensus definitions for sepsis and septic shock (Sepsis-3). *JAMA* 2016; 315(8): 801–810.
- [21] Tambajong RN, Lalenoh DC, Kumaat L. 2014. *Profil penderit sepsis di ICU RSUP Prof. Dr. R. D. Kandou Manado* periode Desember 2014-2015. *Jurnal e-Clinic (eCl)*, 4 (1)
- [22] Torio CM, Andrews RM. 2013. *National inpatient hospital costs: the most expensive conditions by payer*, 2011. Statistical Brief #160. August, 2013. Rockville, MD: Agency for Healthcare Research and Quality.
- [23] Wang, M.R., Wang, D., Guan, X., Li, L., Tang, Y., and Sung, H. 2015. *Effects of local hypothermia on neuronal cell apoptosis after intracerebral hemorrhage in rats*. *The journal of nutrition, health & aging* March 2015, Volume 19, Issue 3, pp 291–298
- [24] Yan, X.J., Shi, Z., Zheng, F.Y., Qin, W.M., Xue, Y.Q., Mei, X.L., Qiu, J.G., Pan, S.S., Jiang, Q.W., Wang, H., Chen, X.X., and Gong, L.H. 2014. Piperlongumine Induces Apoptosis and Synergizes with Cisplatin or Paclitaxel in Human Ovarian Cancer Cells. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, Volume 2014, Article ID 906804, 10 pages <http://dx.doi.org/10.1155/2014/906804>
- [25] Yigitler C, Gulec B, Aydogan H, Ozcan A, Kilinc M, Yigit T. Effect of mesalazine, metronidazole and gentamicin on bacterial translocation in experimental colitis. *J Gastroenterol Hepatol* 2004; 19: 1179-1186.