

## **PENGARUH MELATONIN TERHADAP KADAR ASAM LAKTAT PADA TIKUS WISTAR MODEL SEPSIS**

Diana Kumalasari<sup>1</sup>, Satrio AW<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Mahasiswa Program Pendidikan S-1 Kedokteran Umum, Fakultas Kedokteran, Universitas Diponegoro

<sup>2</sup>Staff Pengajar Ilmu Anestesi, Fakultas Kedokteran, Universitas Diponegoro  
Jl. Prof. H. Soedarto., SH., Tembalang-Semarang 50275, Telp. (024) 76928010

### **ABSTRAK**

**Latar Belakang :** Melatonin merupakan radikal bebas yang sering digunakan sebagai antioksidan. Melatonin merupakan salah satu obat yang sedang dikembangkan sebagai terapi sepsis. Toksisitas serius akibat pemberian melatonin tidak muncul pada pemakaian dosis tinggi. Sepsis menyebabkan peningkatan kadar asam laktat melalui glikolisis anaerob yang terjadi akibat hipoksia jaringan. Melatonin sangat efektif digunakan pada keadaan tersebut, dimana melatonin dapat menurunkan kadar asam laktat sehingga mencegah terjadinya kematian.

**Tujuan :** Mengetahui pengaruh melatonin terhadap kadar asam laktat pada tikus wistar model sepsis dan memperoleh informasi tentang melatonin dalam menurunkan kadar asam laktat.

**Metode :** Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental dengan desain *Randomized Control Group Pre-Post Test*. Sampel adalah 12 ekor tikus wistar jantan dengan kriteria tertentu, dibagi secara acak menjadi 2 kelompok. Kelompok I sebagai kelompok kontrol diberi injeksi Lipopolisakarida (LPS) intraperitoneal dan tidak diberi melatonin. Kelompok II sebagai kelompok perlakuan diberi injeksi LPS intraperitoneal dan melatonin via sonde oral. Setelah tikus diadaptasi selama 7 hari, pada hari ke-8 tikus diinjeksi LPS pada kedua kelompok dan melatonin via sonde oral hanya pada kelompok perlakuan. Kemudian tiap tikus diambil darahnya melalui pembuluh darah retroorbita dan diukur kadar asam laktatnya. Uji statistik menggunakan uji *Paired t-Test*, *Independent t-Test* dan *Mann-Whitney Rank Test*.

**Hasil :** Pada uji *Independent t-Test* didapatkan nilai rerata kadar asam laktat pada kelompok kontrol lebih tinggi dibanding dengan kelompok perlakuan. Pada uji *Paired t-Test* tidak didapatkan perbedaan yang signifikan  $p > 0,05$  pada kelompok kontrol maupun perlakuan kecuali pada post1-post 2 dan pre-post 2 yang memiliki perbedaan yang signifikan pada kelompok kontrol. Pada uji *Mann-Whitney Rank Test* juga tidak didapatkan perbedaan yang signifikan pada selisih pre – post 1 dan selisih pre – post 2.

**Kesimpulan :** Pemberian melatonin tidak menyebabkan penurunan kadar asam laktat yang signifikan.

**Kata kunci:** Sepsis, Kadar Asam Laktat, Melatonin, Lipopolisakarida.

### **ABSTRACT**

## **THE EFFECT OF MELATONIN TO THE LEVEL OF LACTATE ACID IN THE WISTAR RAT MODEL OF SEPSIS**

**Background :** Melatonin was a free radical used frequently as an antioxidant. Melatonin was one of medicine developed as a sepsis therapy. There was no severe toxicity even though high dose was given. Sepsis caused increased levels of lactic acid through anaerobic glycolysis that caused by tissue hypoxia. Melatonin was effectively used to lower lactic acid levels so as to prevent the occurrence of death.

**Objective :** to find out melatonin's influence to the level of lactate acid toward wistar rat in sepsis model and to obtain the information of melatonin in decreasing the level of lactate acid.

**Method :** This research was an experimental research with a randomized control group using pre and post test design. The samples were 12 male wistar rats with certain criteria divided into 2 groups. The first group was given an intraperitoneal injection of lipopolysaccharide (LPS) and was not given melatonin as control group. The second group was given an intraperitoneal injection of lipopolysaccharide (LPS) and was given melatonin via oral sonde as experimental group. After a week, in the eighth day, the blood of each rat was taken from the retro-orbital blood vessel. The statistical test used were paired t-test, independent t-test, and Mann Whitney test.

**Results :** In the independent test, the average score of the level of lactate acid from control group was higher than the experimental group. In the paired t-test, there was no significant difference between control and experimental group except in the post 1 – post 2 and pre-post 2 which had significant difference in control group. In the Mann Whitney test, there was also no significant difference in pre-post 1 and pre-post 2.

**Conclusions :** Melatonin treatment did not cause significant decrease of the level of lactate acid.

**Keywords :** Sepsis, The level of lactate acid, Melatonin, Lipopolysaccharide.

## PENDAHULUAN

Sepsis merupakan sindroma klinik akibat respon yang berlebihan dari sistem imun yang distimulasi oleh mikroba atau bakteri yang dapat menyebabkan kerusakan jaringan, kegagalan organ, dan kematian.<sup>1</sup> Sepsis yang disertai dengan disfungsi organ yang letaknya jauh dari fokal infeksi disebut dengan *severe sepsis*. Sepsis dan komplikasinya merupakan penyebab tersering tingginya angka morbiditas dan mortalitas di ICU.<sup>2</sup> Studi epidemiologi di Amerika Serikat memperlihatkan bahwa angka kejadian sepsis mencapai 750 juta pasien dirawat dirumah sakit dari tahun 1979-2000, didapatkan 10.319.418 diantaranya adalah kasus sepsis.<sup>3</sup> Sedangkan penelitian yang dilakukan oleh The Management of Severe Sepsis in Asia's Intensive Care Units (MOSAIC) study group dengan melibatkan 16 negara di Asia pada tahun 2009, menyebutkan bahwa angka kematian di rumah sakit akibat sepsis adalah 44,5%.<sup>4</sup> Pada tahun 2015, dilakukan penelitian terkait dengan demam, sepsis, tifoid dan HIV. Penelitian sepsis bertujuan untuk memperoleh data penyebab terjadinya penyakit sepsis pada dewasa dan anak-anak. Lokasi penelitian adalah RS dr. Wahidin Sudiro Husodo Makassar dan RS Sardjito Yogyakarta. Data yang diperoleh sampai dengan Mei 2015 berjumlah 42 pasien di RS Wahidin Sudiro Husodo dan 43 pasien di RS Sardjito dari target masing-masing 125 kasus.<sup>5</sup> Hal ini tentu menjadi suatu hal yang tidak bisa diacuhkan begitu saja. Diperlukan

ketepatan dalam melakukan tindakan dan diagnosis dini dari gejala yang muncul agar dapat menghindarkan penderita sepsis dari kematian.

Dalam hal penanganan sepsis, biasanya pasien akan dimasukkan kedalam *Intensive Care Unit* (ICU). Ini dilakukan dikarenakan pada penderita sepsis cenderung ditemukan adanya komplikasi menyeluruh pada sistem organ tubuh. Terapi sepsis di masa depan mungkin akan lebih berkembang seiring dengan pemahaman yang lebih baik tentang patofisiologi sepsis.<sup>6</sup>

Diagnosis sepsis sering menggunakan biomarker, antara lain asam laktat, *C-reactive protein* dan procalcitonin. Biomarker yang digunakan bertujuan untuk dapat memberikan intervensi dini sehingga risiko kematian akibat sepsis dapat dikurangi.<sup>7</sup> Sedangkan *gold standard* untuk mendiagnosis sepsis adalah pemeriksaan kultur bakteri yang memerlukan waktu lebih lama.<sup>8</sup>

Melatonin adalah radikal bebas yang sangat poten dan secara tidak langsung berfungsi sebagai antioksidan. Pengobatan melatonin sangat efektif pada keadaan iskemia atau reperfusi. Melatonin adalah produk endogen dengan penyerapan yang baik melalui injeksi intravena atau oral. Toksisitas serius akibat pemberian melatonin tidak muncul pada pemakaian dosis tinggi.<sup>9</sup> Melatonin merupakan salah satu obat yang sedang dikembangkan sebagai terapi sepsis. Melatonin dapat mengurangi kadar sitokin inflamasi, stress oksidatif dan disfungsi mitokondria. Melatonin sangat efektif digunakan pada keadaan hipoksia jaringan. Keadaan tersebut menyebabkan peningkatan kadar asam laktat melalui mekanisme glikolisis anaerob sehingga melatonin dapat menurunkan kadar asam laktat yang meningkat saat sepsis.<sup>10,11</sup>

Dengan memperhatikan hasil penelitian terdahulu, peneliti tertarik untuk meneliti pengaruh melatonin terhadap kadar asam laktat pada tikus wistar model sepsis dengan menggunakan marker asam laktat.

## METODE

Penelitian eksperimental dengan rancangan *randomized control group pre-post test* yang dilakukan pada kelompok tikus wistar jantan. Kriteria inklusi penelitian ini antara lain, tikus wistar jantan berusia antara 2-3 bulan, berat badan 150-300 gram, tampak aktif selama masa adaptasi dan tidak terdapat kelainan anatomi. Kriteria eksklusi penelitian ini adalah tikus tampak sakit sebelum perlakuan dan tampak kelainan anatomi.

Sampel dikelompokkan dengan *simple random sampling* ke dalam dua kelompok yaitu, kelompok kontrol yang diberi injeksi lipopolisakarida saja dan kelompok perlakuan yang diberi injeksi lipopolisakarida dan melatonin via sonde oral. Besar sampel ditentukan berdasarkan ketentuan WHO, yaitu minimal 5 ekor dan cadangan 2 ekor tikus tiap kelompok. Pada penelitian ini jumlah tikus wistar jantan untuk setiap kelompok sebanyak 6 ekor, sehingga jumlah tikus wistar jantan yang dibutuhkan adalah 12 ekor.

Variabel bebas penelitian ini adalah pemberian suplementasi melatonin. Variabel terikat penelitian ini adalah kadar asam laktat tikus wistar.

Pada penelitian ini terdiri dari 2 kelompok dimana masing-masing kelompok terdiri dari 6 ekor hewan percobaan. Kelompok pertama adalah kelompok kontrol yang hanya diberi injeksi LPS (lipopolisakarida) intraperitoneal dosis 2 mg/200 g tikus. Kelompok kedua adalah kelompok perlakuan yang diberi injeksi LPS intraperitoneal dosis 2 mg/200 g tikus dan melatonin 4 mg/200 g tikus via sonde oral. Tikus diadaptasi terlebih dahulu selama 7 hari. Selama masa adaptasi tikus diberi makan dan minum standar. Pada hari ke-8 kedua kelompok penelitian diberi injeksi LPS intraperitoneal kemudian 6 jam pasca injeksi diambil darahnya melalui vena retroorbita dan diukur kadar asam laktatnya. Selanjutnya kelompok kontrol hanya diberi placebo (aquadest) dan kelompok perlakuan diberi melatonin dosis 4 mg/200 g tikus via sonde oral. Kemudian 1 jam dan 2 jam pasca pemberian melatonin, tikus diambil kembali darahnya melalui vena retroorbita dan diukur kadar asam laktatnya.

Data yang dikumpulkan adalah data primer yang diperoleh dari pembacaan hasil pada alat Accutrend Plus. Kemudian data tersebut diuji normalitasnya dengan uji *Saphiro-Wilk*. Bila diperoleh distribusi data normal, maka dilakukan uji beda menggunakan uji *parametric t-Test*, yaitu *Paired t-Test* dan *Independent t-Test*. Bila distribusi data tidak normal, dilakukan uji beda dengan uji *non-parametric t-Test Mann-Whitney Rank Test*.

**HASIL**

**Tabel 1.** Uji Normalitas Data dengan Uji Shapiro-Wilk

Variabel (Kadar Asam Laktat)	Kelompok		Keterangan
	Kontrol	Perlakuan	
Setelah LPS (pre)	0,260	0,730	Normal
Melatonin 1 (post 1)	0,199	0,377	Normal
Melatonin 2 (post 2)	0,395	0,367	Normal
Δ Setelah LPS – Melatonin 1	0,282	0,755	Normal
Δ Setelah LPS – Melatonin 2	0,849	0,018	Tidak normal

Keterangan :  $p > 0,05$  : data berdistribusi normal

**Tabel 2.** Kadar Asam Laktat pada Kelompok Kontrol dan Perlakuan

Kadar Asam Laktat	Kelompok Kadar Asam Laktat		p
	Kontrol	Perlakuan	
Setelah LPS (pre)	13,43 ± 1,53; 13,0 (11,8-15,4)	9,23 ± 2,46; 8,8 (6,3-13,4)	0,005* <sup>b</sup>
Melatonin 1 (post 1)	13,37 ± 3,03; 13,9 (9,6-16,4)	12,2 ± 5,79; 10,6 (6,6-22,1)	0,671 <sup>b</sup>
Melatonin 2 (post 2)	16,62 ± 1,53; 16,7 (14,6-18,3)	11,8 ± 6,95; 9,6 (5,2-23,6)	0,153 <sup>b</sup>
p (pre-post 1)	0,946 <sup>a</sup>	0,156 <sup>a</sup>	-
p (post 1-post 2)	0,005* <sup>a</sup>	0,874 <sup>a</sup>	-
p (pre-post 2)	0,001* <sup>a</sup>	0,311 <sup>a</sup>	-
Δ pre – post 1	-0,067 ± 2,28; 0,7 (- 3,1-2,7)	2,98 ± 4,38; 2,7 (- 2,9-8,7)	0,171 <sup>b</sup>
Δ pre – post 2	3,183 ± 1,13; 2,95 (1,8 – 4,9)	2,583 ± 5,61; 0,85 (-1,3 – 13,4)	0,229 <sup>c</sup>

Nilai dalam tabel adalah Rerata ± SD; median (min-maks)

\*Signifikan  $p < 0,05$

<sup>a</sup>Uji *Paired t-Test*

<sup>b</sup>Uji *Independent t-Test*

<sup>c</sup>Uji *Mann-Whitney*

Berdasarkan tabel 7, uji *Paired t-Test*, perbandingan kadar asam laktat pada kelompok kontrol pre-post diperoleh nilai ( $p=0,946$ ) yang menunjukkan perbedaan kadar asam laktat yang tidak signifikan, sedangkan pada kelompok yang sama post 1-post 2 diperoleh nilai ( $p=0,005$ ) dan pre-post 2 didapatkan nilai ( $p=0,001$ ) sehingga dapat disimpulkan bahwa kedua data tersebut memiliki perbedaan kadar asam laktat yang signifikan. Kemudian pada kelompok perlakuan memiliki data pre-post 1 nilai ( $p=0,156$ ), post 1-post 2 nilai ( $p=0,874$ ) dan pre-post 2 nilai ( $p=0,311$ ) yang menunjukkan bahwa ketiga data tersebut memiliki perbedaan kadar asam laktat yang tidak signifikan.

Selanjutnya, untuk uji *Independent t-Test*, pada kelompok kontrol dan perlakuan variabel setelah LPS diperoleh nilai ( $p=0,005$ ) yang menunjukkan bahwa LPS memiliki pengaruh yang signifikan terhadap kadar asam laktat. Kemudian untuk variabel melatonin 1 dan melatonin 2 pada kelompok kontrol maupun perlakuan diperoleh nilai  $p$  masing-masing 0,671 dan 0,153, sehingga dapat disimpulkan bahwa LPS tidak memiliki pengaruh yang signifikan terhadap kadar asam laktat pada kedua kelompok tersebut.

Kemudian, hasil yang didapatkan dari uji normalitas untuk data selisih pre dan post seperti selisih pre – post 1 yang memiliki distribusi data normal, diuji menggunakan uji *Independent t-Test* dan diperoleh nilai ( $p=0,171$ ) yang menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang tidak signifikan. Selanjutnya untuk data selisih pre – post 2 yang memiliki distribusi data tidak normal, diuji menggunakan uji *Mann-Whitney Rank Test* dan didapatkan nilai ( $p=0,229$ ) sehingga dapat disimpulkan bahwa terdapat perbedaan yang tidak signifikan.

## PEMBAHASAN

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian melatonin terhadap kadar asam laktat tikus wistar model sepsis. Sampel penelitian ini adalah 12 ekor tikus wistar yang telah memenuhi kriteria inklusi yang ditetapkan. Dari ke-12 tikus wistar tersebut dibagi menjadi 2 kelompok yaitu 6 ekor tikus wistar sebagai kelompok kontrol dan 6 ekor tikus wistar sebagai kelompok perlakuan yang diberi injeksi intraperitoneal LPS dan melatonin via sonde oral.

Analisis data didapatkan perbedaan yang bermakna dari kadar asam laktat pada kelompok kontrol (diberi injeksi LPS intraperitoneal dan placebo via sonde oral) dengan kelompok perlakuan (diberi injeksi LPS intraperitoneal dan melatonin via sonde oral).

Dimana pada kelompok kontrol kadar asam laktat mengalami peningkatan terus menerus dibanding kelompok perlakuan yang mengalami perubahan tapi tidak sesuai hipotesis.

Definisi sepsis adalah infeksi yang disertai dengan *systemic inflammatory response syndrome (SIRS)*. Angka kematian sepsis yang tinggi, utamanya pada pasien – pasien dengan penyakit kritis mendorong untuk dilakukannya penelitian – penelitian tentang obat – obatan yang dapat menghambat kaskade inflamasi.<sup>12</sup>

Asam laktat atau laktat merupakan hasil akhir dari proses metabolisme. Diperkirakan 1400 mmol/L asam laktat diproduksi setiap hari. Semua jaringan dapat memproduksi asam laktat dan asam piruvat dari glukosa.<sup>13</sup> Sepsis dan syok sepsis berhubungan dengan hiperlaktatemia (*Sepsis Associated Hyperlactatemia*). Hingga saat ini SAHL diakui sebagai marker pada keadaan hipoksia jaringan yang berfungsi untuk menunjukkan adanya ‘*oxygen debt*’ atau ‘*hypoperfusion*’ yang menyebabkan terjadinya peningkatan asam laktat melalui glikolisis anaerob. Penambahan oksigen pada pasien merupakan langkah awal terapi SAHL dan asam laktat digunakan sebagai metode evaluasi keberhasilan resusitasi dan respon tubuh terhadap terapi awal tersebut.<sup>14</sup>

Melatonin merupakan molekul serbaguna, disintesis tidak hanya oleh kelenjar pineal melainkan juga oleh banyak organ. Melatonin berperan dalam pengaturan siklus tidur dan irama sirkadian, *immunoregulation*, antioksidan dan fungsi proteksi mitokondria, reproduksi, dan mood.<sup>15</sup> Sejak tahun 1926 telah dilaporkan efek pemberian melatonin untuk meningkatkan resistensi terhadap infeksi virus dan bakteri pada hewan coba. Dari penelitian-penelitian setelahnya diketahui melatonin berperan dalam melawan radikal bebas, meningkatkan respon imun, dan membantu proses sitoprotektif. Dalam beberapa model hewan, melatonin telah diidentifikasi untuk membantu melawan infeksi yang disebabkan bakteri, virus, dan parasit. Dengan melalui berbagai mekanisme, seperti immunomodulasi atau aktivitas antioksidan. Melatonin merupakan salah satu obat yang dikembangkan sebagai terapi sepsis. Melatonin dapat mengurangi kadar sitokin inflamasi, stress oksidatif dan disfungsi mitokondria.<sup>10</sup> Bukti pertama yang menyatakan bahwa melatonin dapat mengontrol kerusakan akibat lipopolisakarida pada tikus dikemukakan oleh Sewerynek et al yang melaporkan bahwa pemberian melatonin dapat menurunkan stres oksidatif akibat induksi LPS, yang terbukti dengan menurunnya *Malondialdehyde (MDA)* hepar dan *4-hydroxyalkenal (4-HDA)*.<sup>16</sup> Melatonin dapat mencegah endotoksemia akibat induksi LPS

dengan menurunkan sirkulasi TNF- $\alpha$ , produksi superoksida dalam aorta, dan iNOS dalam hepar.<sup>17</sup> Pemberian melatonin (10-60 mg/kgBB) intraperitoneal pada tikus sebelum dan setelah pemberian LPS secara signifikan dapat menurunkan peroksidasi lemak pada paru dan menetralkan peningkatan NO akibat induksi LPS dalam paru dan hepar dengan dosis yang tepat.<sup>18</sup> Pemberian melatonin (60 mg/kgBB) secara efektif dapat menurunkan aktivitas NOS mitokondria dan produksi NO, sehingga dapat mencegah toksisitas akibat LPS.<sup>19</sup>

Lama paparan dan dosis berperan dalam memengaruhi efek melatonin terhadap penurunan kadar asam laktat. Kaya O et al dalam penelitiannya yang berjudul *Melatonin Supplementation to Rats Subjected to Acute Swimming Exercise : It's Effect on Plasma Lactate Levels and Relation with Zinc* menyebutkan bahwa penurunan kadar asam laktat yang signifikan pada pemberian melatonin dosis 3 mg/kg/hari selama 28 hari.<sup>20</sup> Sedangkan pada penelitian ini, dengan dosis 4 mg/200 g tikus selama 1 jam dan 2 jam pasca injeksi LPS intraperitoneal tidak didapatkan penurunan kadar asam laktat yang signifikan. Dengan demikian, pada lama pemberian dapat menurunkan kadar asam laktat. Sedangkan lama pemberian yang singkat tidak menyebabkan kenaikan kadar asam laktat.

Tilden A et al menyatakan bahwa melatonin menyebabkan pergeseran dalam siklus glukosa dan laktat. Melatonin menyebabkan peningkatan glukosa menjadi tertunda yang bersamaan dengan hal tersebut kenaikan laktat menjadi lebih rendah.<sup>21</sup> Pernyataan Tindel A et al didukung dengan hasil penelitian yang dilakukan oleh penulis. Hasil penelitian tersebut menyebutkan melatonin tidak menurunkan kadar asam laktat secara signifikan namun melatonin dapat mencegah kenaikan kadar asam laktat akibat sepsis menjadi tidak terlalu tinggi. Hal tersebut terlihat dari hasil statistik dimana kadar asam laktat pada kelompok perlakuan setelah injeksi LPS mengalami peningkatan yang jauh dari normal dan setelah diberi melatonin mengalami penurunan yang tidak signifikan bahkan sedikit sekali atau bisa dibilang setelah pemberian melatonin kadar asam laktat tidak lagi mengalami pelonjakan seperti setelah injeksi LPS.

Keterbatasan pada penelitian ini adalah penulis tidak dapat mengontrol beberapa faktor seperti lingkungan, asupan makanan, penyakit lain, serta internal tikus seperti stres dan daya tahan. Oleh karena itu, perlu penelitian lebih lanjut dengan objek penelitian lebih banyak serta dengan terapi sepsis yang lain.

## SIMPULAN DAN SARAN

### Simpulan

Berdasarkan hasil penelitian diatas dapat diambil kesimpulan bahwa melatonin tidak dapat menurunkan kadar asam laktat tetapi melatonin dapat mencegah peningkatan kadar asam laktat yang berlebihan. Selain itu, melatonin merupakan suplemen sehingga tidak dapat digunakan terapi utama sepsis. Oleh karena itu, melatonin hanya dapat digunakan sebagai terapi pendamping.

### Saran

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai pengaruh pemberian melatonin dosis bertingkat dan lama paparan yang bervariasi dan dengan melakukan analisis kimia darah lain untuk mengetahui tingkat kerusakan organ akibat pemberian lipopolisakarida. Selain itu, diperlukan studi epidemiologi mengenai dosis aman melatonin dalam penggunaannya sebagai antioksidan.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Puji syukur kehadiran Tuhan Yang Maha Esa, karena atas berkat dan rahmat-Nya penulis dapat menyelesaikan Karya Tulis Ilmiah ini. Penulis juga berterima kasih kepada dr. Satrio Adi Wicaksono Sp.An selaku dosen pembimbing karya tulis ilmiah, dr.Widya Istanto Nurcahyo,Sp.An, KAKV, KAR selaku ketua penguji, dr. Endang Sri Lestari, Ph.D selaku penguji, serta keluarga dan teman-teman yang senantiasa memberikan doa dan dukungan sehingga penulisan hasil karya tulis ilmiah ini dapat terselesaikan.

## DAFTAR PUSTAKA

1. Vincent J-L. Clinical sepsis and septic shock--definition, diagnosis and management principles. *Langenbecks Arch Surg.* 2008;393(6):817-824.
2. Vincent J-L, Sakr Y, Sprung CL, et al. Sepsis in European intensive care units: results of the SOAP study. *Crit Care Med.* 2006;34(2):344-353.
3. Martin GS, Mannino DM, Eaton S, Moss M. The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. *N Engl J Med.* 2003;348(16):1546-1554.
4. Phua J, Koh Y, Du B, et al. Management of severe sepsis in patients admitted to Asian intensive care units: prospective cohort study. *BMJ.* 2011;342:d3245.
5. Indonesian Research Partnership on Infectious Disease (INA-RESPOND) | Pusat Teknologi Terapan Kesehatan Epidemiologi Klinis. [http://www.pusat2.litbang.depkes.go.id/pusat2\\_v1/supervisi-kabandan-ke-site-ina-respond/](http://www.pusat2.litbang.depkes.go.id/pusat2_v1/supervisi-kabandan-ke-site-ina-respond/). Accessed November 19, 2015.

6. Cohen J. The immunopathogenesis of sepsis. *Nature*. 2002;420(6917):885-891.
7. Faix JD. Biomarkers of sepsis. *Crit Rev Clin Lab Sci*. 2013;50(1):23-36.
8. de Jager CPC, van Wijk PTL, Mathoera RB, de Jongh-Leuvenink J, van der Poll T, Wever PC. Lymphocytopenia and neutrophil-lymphocyte count ratio predict bacteremia better than conventional infection markers in an emergency care unit. *Crit Care*. 2010;14(5):R192.
9. Pandi-Perumal SR, Cardinali DP. *Melatonin: From Molecules to Therapy*. Nova Publishers; 2007.
10. Kurdi MS, Patel T. The role of melatonin in anaesthesia and critical care. *Indian J Anaesth*. 2013;57(2):137-144.
11. Galley HF, Lowes DA, Allen L, Cameron G, Aucott LS, Webster NR. Melatonin as a potential therapy for sepsis: a phase I dose escalation study and an ex vivo whole blood model under conditions of sepsis. *J Pineal Res*. 2014;56(4):427-438.
12. Lubis SM, Lubis M. Asidosis Laktat. *Majalah Kedokteran Nusantara*. 2006;39(1):53-58.
13. Garcia-Alvarez M, Marik P, Bellomo R. Sepsis-associated hyperlactatemia. *Crit Care*. 2014;18(5):503.
14. Srinivasan V, Pandi-Perumal SR, Spence DW, Kato H, Cardinali DP. Melatonin in septic shock: some recent concepts. *J Crit Care*. 2010;25(4):656.e1-e6.
15. Kurdi MS, Patel T. The role of melatonin in anaesthesia and critical care. *Indian J Anaesth*. 2013;57(2):137-144.
16. Sewerynek E, Melchiorri D, Reiter RJ, Ortiz GG, Lewinski A. Lipopolysaccharide-induced hepatotoxicity is inhibited by the antioxidant melatonin. *Eur J Pharmacol*. 1995;293(4):327-334.
17. Wu CC, Chiao CW, Hsiao G, Chen A, Yen MH. Melatonin prevents endotoxin-induced circulatory failure in rats. *J Pineal Res*. 2001;30(3):147-156.
18. Crespo E, Macías M, Pozo D, et al. Melatonin inhibits expression of the inducible NO synthase II in liver and lung and prevents endotoxemia in lipopolysaccharide-induced multiple organ dysfunction syndrome in rats. *FASEB J*. 1999;13(12):1537-1546.
19. Escames G, León J, Macías M, Khaldy H, Acuña-Castroviejo D. Melatonin counteracts lipopolysaccharide-induced expression and activity of mitochondrial nitric oxide synthase in rats. *FASEB J*. 2003;17(8):932-934.
20. Kaya O, Gokdemir K, Kilic M, Baltaci AK. Melatonin supplementation to rats subjected to acute swimming exercise: Its effect on plasma lactate levels and relation with zinc. *Neuro Endocrinol Lett*. 27(1-2):263-266.
21. Tilden A, McGann L, Schwartz J, Bowe A, Salazar C. Effect of melatonin on hemolymph glucose and lactate levels in the fiddler crab *Uca pugnator*. *J Exp Zool*. 2001;290(4):379-383.