PENGARUH PROPOLIS TERHADAP KOLAGENISASI PADA PROSES PENYEMBUHAN LUKA SUBKUTAN PUNGGUNG MENCIT YANG DIINDUKSI BAKTERI ACTINOBACILLUS ACTINOMYCETEMCOMITANS

Asdar

Bagian Periodonsia

Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Hasanuddin

Abstract

Propolis, the resinous hive product by bees, is important in the defence of the hive. It is known that extract of propolis exhibits such pharmacological activities as antimicrobial, antiviral, antifungal, anti-inflammatory, immunostimulatory and promote wound healing. The objective of this study was to investigate the influence of the propolis on the formation of collagen in the wound healing process of the subcutaneous injury of mice that were induced with Actinobacillus actinomycescomitans (A.actinomycescomitans)

This study applied 24 female BALB/c mice of 2 - 3 months of age with the weight of 20 -30 grams. On the first day the whole population were injected with A.actinomycescomitans subcutaneously. The second day mice were randomly divided into two groups that was the group with special treatment and the controlled ones. The group under treatment were given the extract of propolis 100 mg/kg body weight every day. While the controlled ones were only given aquades.

Histological observation was conducted upon each group on the third, seventh and fourteenth days after A. actinomycescomitans injection. The results of the observation was based on the density collagen fiber. The data obtained then analyzed by using Mann-Whitney U test. The results of the present study indicated that the administration of 100 mg/kg BW propolis peroral may stimulate collagen synthesis.

Keywords: *Propolis, Actinobacillus actinomycescomitans, Collagen fiber*

PENDAHULUAN

Penyakit periodontal disebabkan oleh akumulasi bakteri plak dan produknya pada permukaan gigi dan subgingiva. Diantara lebih 300 spesies bakteri yang ditemukan dalam rongga mulut manusia, diperkirakan hanya 10 - 20 spesies yang berperan dalam patogenesis penyakit periodontal destruktif. Salah satu bakteri yang diketahui dominan pada penyakit periodontal destruktif adalah *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (*A. actino-mycetemcomitans*).¹⁻² Bakteri ini dikenal sebagai penyebab sejumlah infeksi pada rongga mulut, terutama penyakit periodontal yang destruktif pada orang dewasa. Disamping itu bakteri ini juga diketahui dapat menyebabkan infeksi ekstra oral diantaranya endocarditis, abses otak, pneumonia, osteomyelitis dan infeksi pada saluran kencing.³⁻⁴⁵ Pada percobaan yang dilakukan pada mencit, ditemukan bahwa bakteri ini dapat menimbulkan abses subkutan.⁶ Kemampuan

A. actinomycetemcomitans sebagai agen etiologi penyakit periodontal destruktif disebabkan bakteri tersebut memiliki sejumlah determinan virulensi yaitu : "pacteriocin, leukotoksin, kolagenase, endotoksin, fibroblast inhibitory factor, bone resorption inducing factor, menginduksi produksi sitokin dari makrofag, memodifikasi fungsi netrofil, dan secara in vitro mendegradasi imunoglobulin yang menginvasi sel-sel epitel. Selain itu juga terjadi respon pada pejamu berupa peningkatan antibodi dalam serum atau saliva pada pasien LJP.⁷

Kolagen adalah protein berbentuk serat yang tersebar luas dalam tubuh dan merupakan bagian utama jaringan ikat padat sehingga kolagen merupakan protein fibrosa terbanyak dalam tubuh (30% dari total protein). Kolagen merupakan komponen utama kartilago dan tulang, tendo, ligamen, otot, kulit dan struktur lainnya.^{9,10} Sel yang berperan dalam proses pembentukan kolagen adalah fibroblas. Penghambatan

pertumbuhan atau kerusakan fibroblas akan diekspresikan sebagai penurunan sintesis kolagen dan selanjutnya akan termanifestasi dalam beberapa bentuk penyakit periodontal maupun penyakit lainnya.^{8,9}

Walaupun telah diterima secara umum bahwa antibiotik tidak diperlukan dalam perawatan rutin periodontitis, tetapi dengan seringnya terjadi kegagalan pada perawatan secara mekanis, maka pemberian antibiotik sebagai terapi tambahan perawatan penyakit periodontal secara mekanis dapat menjadi pertimbangan."

Dewasa ini terdapat usaha memanfaatkan bahan-bahan alami dalam pelayanan kesehatan, Propolis merupakan salah satu produk alami yang dihasilkan oleh lebah madu yang digunakan sebagai perekat untuk memelihara sarangnya.¹² Sejumlah penelitian menunjukkan bahwa propolis mempunyai efek antimikroba terhadap bakteri (gram positif dan gram negatif), anti jamur dan anti viral. 13-15 Efek lain dari propolis

adalah kemampuannya untuk menstimulasi sistem imun, serta memacu pembentukan sel dan jaringan.

Pada penelitian ini, pembuatan luka pada mencit dilakukan dengan menginjeksi secara subkutan punggung mencit dengan bakteri *A.actinomycetem-comitans* sehingga akan terjadi abses subkutan.⁶

BAHAN DAN CARA

1. Pembuatan Ekstrak Propolis

Propolis yang digunakan adalah propolis dari jenis lebah *Trigona* sp., yang berasal dari Sulawesi Selatan. Proses ekstraksi propolis dilakukan di laboratorium PPOT-UGM. Teknik ekstraksi yang digunakan adalah teknik Reflux. Setelah dilakukan ekstraksi, etanol diuapkan sehingga diperoleh ekstrak kering. Propolis tersebut kemudian diencerkan dengan akuades untuk mendapatkan konsentrasi 2 mg/ml. Dosis yang digunakan dalam penelitian ini adalah dosis tunggal sebesar 100 mg/kg BB atau 0,1 mg/g BB.

2. Preparasi

Bakteri

A.actinomycetemcomitans

Pembiakan bakteri. Bakteri

A.actinomycetemcomitans diperoleh dari laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Hewan - UGM. Bakteri tersebut dikultur dalam Tood- Hewitt Broth (Oxoid). Media pembiakan bakteri dibuat dengan cara: 30 g Tood- Hewitt Broth dimasukkan dalam 1 liter akuades, disuplemen dengan 1% (wt/v) yeast extract kemudian disterilkan dalam autoklaf (121°C selama 15 menit). Suasana anaerob diperoleh dengan memasukkan dalam sumpung anaerob. Kemudian sumpung anaerob dimasukkan dalam inkubator (pada suhu 37°C dengan 5% CO₂). Bakteri dipanen setelah 6 hari. Perhitungan jumlah

sel bakteri *A.actinomycetemcomitans*.

Untuk menimbulkan abses subkutan pada punggung mencit digunakan bakteri *A.actinomycetemcomitans* dengan jumlah sel 1×10^{11} . Perhitungan jumlah sel dilakukan menggunakan haemositometer dengan cara : suspensi bakteri yang telah

diencerkan sebanyak 10 ml dituang dalam tabling eppendorf dan ditambah 90 ml tripan biru. Sepuluh mikroliter suspensi hasil pengecatan ini lalu dituang ke chamber haemositometer, kemudian diamati dibawah mikroskop cahaya dengan pembesaran 400 X. Total jumlah sel bakteri dari setiap 1 ml suspensi bakteri ditentukan dengan menggunakan formulasi : Sel per ml = $A \times 10 \times 10^4$ (A = jumlah bakteri dalam 5 kotak). Suspensi bakteri dibuat dalam jumlah 1×10^8 bakteri/100 ml PBS steril.

3. Pelaksanaan Penelitian

Dalam penelitian ini digunakan mencit *BALB/c* betina umur 8-10 minggu dengan berat badan 20 - 30 g. Dua puluh empat ekor mencit yang telah dipilih sesuai dengan kriteria dibagi dalam 2 kelompok yang sama besar yang dibagi secara acak. Kedua kelompok diinjeksi bakteri *A.actinomycetemcomitans* pada hari pertama.

Mulai pada hari kedua kelompok perlakuan diberi ekstrak

propolis peroral dengan dosis 100 mg/kg/BB/hari, sedang kelompok kontrol diberi plasebo dengan dosis dan cara yang sama dengan kelompok perlakuan.

Cara pembuatan luka/abses pada punseuns mencit. Alat suntik 1 ml diisi suspensi bakteri *A.actinomycetemcomitans* yang berisi 1×10^8 bakteri. Mencit disiapkan pada alat fiksasi (trap) yang selanjutnya disuntik secara subkutan pada daerah punggung.

Cara pemberian obat peroral. Pemberian ekstrak propolis dan plasebo dilakukan sehari setelah injeksi *A.actinomycetemcomitans* pada kelompok perlakuan dan kontrol. Pemberian obat dilakukan dengan alat suntik yang telah dimodifikasi ujung jarumnya diberi bulatan kecil dengan diameter 2 mm atau kanula. Kanula tersebut dimasukkan ke mulut mencit tersebut. Kemudian secara perlahan-lahan kanula dimasukkan sampai ujungnya mencapai lambung (*intragastic*), lalu alat suntik ditekan secara perlahan agar obatnya masuk ke lambung mencit

(100 mg/kg/BB/hari).

Pensukuran diameter luka/abses. Cara pengukuran dilakukan dengan menggunakan jangka sorong. Diukur diameter terpanjang dan terpendek dari abses, kemudian dihitung nilai reratanya.

Pembuatan dan pengecatan sediaan histologic Pemeriksaan histologis dilakukan pada hari ke-3, ke-7 dan ke-14 pada kedua kelompok. Proses pembuatan sediaan dan pengecatan serabut kolagen dilakukan dengan metode Mallory.¹⁹ Pemilihan sediaan. Bagian yang menjadi target pengirisan adalah titik pusat luka atau bekas luka yang telah ditandai sebelumnya. Setiap blok jaringan diiris menjadi 15 irisan. Arah pemotongan dari permukaan luar kulit ke dalam (vertikal). Dari 15 irisan diambil 5 irisan secara acak untuk diwamai. Dari 5 irisan/preparat diambil 1 sampel secara acak, sehingga didapatkan 4 sampel dari tiap kelompok. Pengamatan dan pengumpulan data. Pengamatan serabut kolagen

dilakukan di bawah mikroskop cahaya. Kriteria penilaian histologis dibuat berdasarkan kepadatan serabut kolagen yang dibuat dengan modifikasi kriteria pada penelitian Soesilowati-Handogo.²⁰ Penilaian dilakukan berdasarkan kriteria sebagai berikut:

- (+) : Serabut kolagen terlihat sangat tipis sedikit?
- (++) : Serabut kolagen terlihat menyebar tipis sedikit
- (+++): Serabut kolagen terlihat sedang
- (++++): Serabut kolagen terlihat padat/tebal

Hasil yang diperoleh diubah dalam bentuk skor sebagai berikut:

(+) skor = 1; (++) skor = 2; (+++) skor = 3; (++++) skor = 4%.

Data yang diperoleh selanjutnya dianalisis secara statistik menggunakan metode statistik Mann-Whitney U test dengan taraf signifikansi 95%.

HASIL PENELITIAN

Rangkuman hasil pengujian statistik menggunakan uji Mann-Whitney untuk mengetahui

kebermaknaan pengaruh propolis terhadap kepadatan serabut kolagen antara kelompok perlakuan dan kelompok kontrol ditunjukkan pada label 1.

Tabel 1. Hasil uji Mann-Whitney pengaruh propolis terhadap kepadatan serabut kolagen dan antara kelompok kontrol (A) dan kelompok perlakuan (B)

Penilaian		Mean Rank		p
		Klp.A	Klp.B	
Kepadatan serabut kolagen		9.33	15.67	0.022*

Keterangan: *: bermakna pada $p < 0,05$

Pada Tabel 1 tampak bahwa kepadatan serabut kolagen kelompok perlakuan menunjukkan perbedaan yang bermakna dibanding kelompok kontrol ($p < 0,05$).

Untuk mengamati lebih lanjut pengaruh lama waktu pemberian propolis terhadap kepadatan serabut kolagen antara kelompok perlakuan dan kontrol dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Hasil uji Mann-Whitney perbedaan kepadatan serabut kolagen antara kelompok kontrol(A) dan kelompok perlakuan

(B) pada hari-hari pengamatan:

Hari ke	Mean Rank			P'
	Kip.	A	Klp.B	
3-	4,00		5,00	0,495
7	3,00		6,00	0,046*
14	2,75		6,26	0,036 *

Keterangan: *bermakna pada $p \leq 0.05$

Hasil analisis statistik pada Tabel 2 tampak bahwa pada hari ke-3, selisih diameter abses awal-akhir menunjukkan perbedaan yang bermakna antara kelompok perlakuan dan kontrol ($p < 0,05$), sedangkan kepadatan serabut kolagen antara kelompok perlakuan dan kontrol tidak berbeda bermakna ($p > 0,05$), sedang pada hari ke-7 dan ke-14, kepadatan serabut kolagen menunjukkan perbedaan yang bermakna antara kelompok perlakuan dan kontrol ($p < 0,05$).

Berdasarkan pengamatan histologis, tampak bahwa pada hari ke-3 serabut kolagen sudah terbentuk pada kedua kelompok, walaupun kepadatannya masih terlihat sangat tipis, dan tidak tampak perbedaan kepadatannya serabut kolagen antara kelompok perlakuan dengan kelompok kontrol. Selanjutnya pada hari ke-7,

menunjukkan kepadatan serabut kolagen yang semakin tinggi. Hasil pengamatan ini didukung analisis statistik pada tabel 2. Gambaran serabut kolagen daerah luka subkutan punggung mencit kelompok perlakuan dan kontrol pada hari ke-7 ditunjukkan pada Gambar 1.

Pada pengamatan histologis pada hari ke-14, tampak bahwa serabut kolagen pada kedua kelompok semakin padat. Data analisis statistik pada Tabel 2 juga menunjukkan bahwa kepadatan serabut kolagen pada kelompok perlakuan lebih tinggi dari kelompok kontrol.

Gambar 1A. Gambaran serabut kolagen daerah subkutan punggung mencit pada hari ke-7. pada kelompok perlakuan. Serabut kolagen tampak berwarna biru. Pengecatan Mallory. Pembesaran 100 X.

Gambar IB. Gambaran serabut kolagen daerah subkutan punggung mencit pada hari ke-7. pada kelompok kontrol. Serabut kolagen tampak berwarna biru. Pengecatan Mallory. Pembesaran 100 X.

PEMBAHASAN

Hasil penelitian menunjukkan bahwa kepadatan serabut kolagen pada kelompok perlakuan yang diberi propolis dengan dosis 100 mg/kg BB berbeda bermakna dibanding kelompok kontrol. Ini dapat diartikan bahwa kolagenisasi luka mencit yang diinduksi bakteri *A. actinomycetemcomitans* pada kelompok perlakuan lebih cepat dibanding kelompok kontrol. Menurut Kaal,¹⁷ Scheller dkk²¹ dan Ghizalberti²² salah satu karakteristik propolis adalah mempunyai kemampuan menstimulasi pembentukan sel dan jaringan. Karakteristik ini penting dalam mempercepat penyembuhan luka.

Walaupun dalam studi literatur tidak disebutkan peran propolis secara langsung terhadap fibroblas, dapat diduga bahwa propolis berpengaruh secara tidak langsung terhadap fibroblas, yaitu antara lain melalui perantara makrofag. Dari penelitian Scheller dkk²¹ disebutkan bahwa propolis mempunyai sifat imunogenitas dengan cara mengaktifasi makrofag. Dapat diduga makrofag inilah yang selanjutnya menstimulasi fibroblas untuk memproduksi serabut kolagen. Pendapat tersebut didukung Tatefuji dkk yang menyatakan bahwa propolis mempunyai efek meningkatkan penyebaran dan mobilitas makrofag murine. Menurut Fawcett²⁴ dan Hefti²⁵ makrofag antara lain memproduksi Interleukin 1 (IL-1), fibroblast growth factor (FGF) dan tumor necrotizing factor (TNF). Fibroblast growth factor diketahui mempunyai kemampuan menginduksi proliferasi fibroblas mencit, sedang IL-1 mempunyai fungsi antara lain memediasi remodeling, reparasi dan inflamasi

jaringan melalui proses fisiologis dan patologis. Interleukin 1 dan TNF dapat memacu proliferasi fibroblas. Keduanya bersifat kemotaksis terhadap fibroblas dan selanjutnya menstimulasi sintesis kolagen.²⁶

Pada hari ke-3, walaupun didapatkan bahwa dari data kasar tampak kepadatan serabut kolagen kelompok perlakuan lebih tinggi dari kelompok kontrol, namun hasil analisis statistik tidak berbeda bermakna. Hal ini mungkin disebabkan karena pada hari ke-3 virulensi bakteri *A. actinomycetemcomitans* masih tinggi yang ditandai dengan diameter abses pada kedua kelompok belum menurun. Dengan demikian aktivitas toksin bakteri masih lebih dominan dibanding zat aktif propolis. Menurut Mitchell dan Cotran²⁶ dan Spector dan Spector²⁷ penyebab paling lazim dalam gangguan proses kolagenisasi adalah inflamasi aktif yang terus menerus disebabkan oleh infeksi bakteri. Diketahui bahwa bakteri *A. actinomycetemcomitans* memiliki sejumlah determinan virulensi yang

kompleks, yaitu antara lain: leukotoksin, kolagenase, fibroblast inhibitory factor (FIF).^{7,8} Leukotoksin *A. actinomycetemcomitans* memperlihatkan spesifisitas sitolitik dengan merusak lekosit polimorfonuklear (PMN) dan makrofag.⁸ Menurut Socransky dan Haffajee,²⁸ leukotoksin *A. actinomycetemcomitans* tidak hanya memengaruhi PMN dan monosit/makrofag, tapi juga membunuh limfosit B dan T, atau memfasilitasi penekanan sel-sel imun. Bakteri ini juga memproduksi protein yang dapat mengaktivasi penekanan sel T. Selain itu adanya determinan virulensi kolagenase pada bakteri *A. actinomycetemcomitans* menyebabkan degradasi kolagen yang sudah terbentuk dalam jaringan, yang semakin diperparah oleh adanya FIF yang menghambat sintesis kolagen. Penghambatan pertumbuhan fibroblas diekspresikan dengan penurunan sintesis kolagen. Dalam keadaan normal juga diketahui bahwa serabut kolagen terbentuk pada sekitar hari

ke-5.²⁹ Dengan demikian dapat difahami mengapa pada hari ke-3 penampakan serabut kolagen pada kelompok perlakuan dan kontrol masih sangat sedikit.

Hasil analisis statistik pada hari ke-7 dan 14 menunjukkan bahwa kepadatan serabut kolagen pada kelompok perlakuan berbeda bermakna dengan kelompok kontrol. Ini berarti bahwa pada hari ke-7 dan 14 serabut kolagen pada kelompok perlakuan menunjukkan kepadatan yang lebih tinggi dibanding dengan kelompok kontrol.

Analisis decara deskriptif pada Tabel 3 menunjukkan bahwa sampai pada hari ke-3 tidak ada dari kedua kelompok yang menunjukkan penyembuhan luka abses. Selanjutnya pada kelompok hari ke-7, satu dari kelompok perlakuan menunjukkan penyembuhan, sedangkan pada kelompok kontrol tidak ada. Pada kelompok hari ke-14, tiga dari kelompok perlakuan menunjukkan penyembuhan, sedangkan pada kelompok kontrol tetap tidak ada. Dari data ini dapat diduga bahwa ekstrak propolis

mempunyai potensi antimikroba secara in vivo terhadap bakteri *A.actinomycescomitans*. Menurut Kaal,¹⁷ Root³⁰ kandungan asam ferulat dari propolis diketahui mempunyai efek antimikroba terhadap bakteri gram positif dan gram negatif. Dengan efek antimikroba tersebut maka jumlah maupun virulensi bakteri *A.actinomycescomitans* akan menurun, yang selanjutnya memfasilitasi terjadinya proses kolagenisasi dengan baik. Komponen cinnamic dan flavonoid dari propolis dilaporkan juga dapat menghambat motilitas bakteri.¹⁵ Untuk membuktikan daya antimikroba propolis terhadap bakteri *A.actinomycescomitans* diperlukan penelitian lebih lanjut. Sementara itu, pada kelompok perlakuan yang belum mengalami penyembuhan maupun kelompok kontrol, proses sintesis serabut kolagen juga tetap berlangsung, sebagaimana hasil yang ditunjukkan di bawah pengamatan mikroskop serta dalam uji statistik yang dapat dilihat pada Tabel 2. Dari fakta

tersebut dapat diajukan bahwa walaupun masih terdapat aktivitas bakteri *A.actinomycetemcomitans* pada daerah luka namun tidak menghentikan proses sintesis kolagen oleh fibroblas. Hal ini mungkin disebabkan karena pada hari k-7 dan 14, virulensi bakteri *A.actinomycetemcomitans* sudah mulai menurun. Penelitian yang dilakukan oleh Saglie dkk³¹ menunjukkan bahwa konsentrasi yang rendah lipopolisakarida (LPS) dari bakteri *A.actinomycetemcomitans* menstimulasi makrofag yang selanjutnya mempengaruhi IL-1 a, IL-1 b dan tumor necrotizing factor (TNF). Hal ini didukung oleh Takemura dkk (1998) cit. Susilowati³² yang menyatakan bahwa pengaruh LPS pada proliferasi sel tergantung pada konsentrasi stimulasi. Pengaruh LPS bersifat bifasik, berarti pada konsentrasi rendah LPS mampu meningkatkan proliferasi sel, sebaliknya pada konsentrasi yang lebih tinggi. Seperti yang telah disebutkan IL-1 dan TNF dapat

menstimulasi fibroblas mensintesis kolagen. Walaupun proses kolagenisasi terjadi pada kedua kelompok, hasil analisis statistik menunjukkan bahwa kepadatan serat kolagen pada kelompok perlakuan lebih tinggi dari pada kelompok kontrol. Kondisi ini disamping berkaitan dengan efek antimikroba dari ekstrak propolis yang diberikan secara sistemik pada kelompok perlakuan, juga mungkin disebabkan oleh karakteristik propolis yang dapat menstimulasi sistem imun. Aktivitas imunologis dari propolis diduga berkaitan dengan aktivasi makrofag yang meningkatkan kapasitas fagositnya dan juga pengaruhnya terhadap faktor-faktor regulasi sel B dan sel T.²¹

KESIMPULAN

Dari hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa pemberian propolis peroral dengan dosis 100 mg/kg BB dapat memacu kolagenisasi luka subkutan punggung mencit yang diinduksi bakteri *Actinobacillus*

actinomycetemcomitans.

SARAN

Diperlukan penelitian lebih lanjut mengenai pengaruh propolis terhadap aktivitas sel makrofag dan fibroblas secara langsung.

DAFTAR PUSTAKA

1. Carranza, F.A., (ed), 1984, Glickman's Clinical Periodontology, Ed. Ke-6, W.B. Saunders Company, Philadelphia, Him. 361-90.
2. Socransky, S.S. and Haffajee, A.D., 1994, Evidence of bacterial etiology: a historical perspective, Periodontol. 2000, 5:7-25.
3. Brooks, G.F., Butel, J.S. and Ornstein, L.N., 1991, Jawetz, Melnick and Adelberg's medical microbiology, Ed. ke-19, Appleton & Lange, California, Him. 227.
4. Kaplan, A.H., Weber, D.J., Oddone, E.Z. and Perfect, J.R., 1989, Infection due to Actinobacillus actinomycetemcomitans: 15 cases and review, Rev. Infect. Dis. 11:46-63.
5. Pickett, M.J., Hollis, D.G., and Bottone, E.J., 1991, Miscellaneous Gram negative Bacteria. Dalam Manual of Clinical Microbiology, I.A. Balows, editor, Ed. ke-5, American Society for Microbiology, Washington D-C, Him. 420.
6. Chen, P.B., Davern, L.B., Neiders, M.E., Reynolds, H.M. and Zambon, J.J., 1991, Analysis on in vitro lymphoproliferative responses and antibody formation following subcutaneous injection of Actinobacillus actinomycetemcomitans and Wolinella recta in a murine model, Oral Microbiol. Immunol., 6:12-16.
7. Haffajee, A.D. and Socransky, S.S., 1994, Microbial etiological agents of destructive periodontal diseases, Periodontol. 2000, 5: 78-111.
8. Fives-Taylor, P.M., Meyer, D. and Mintz, K., 1996, Virulence factors of the periodontopathogen Actinobacillus

- actinomycetemcomitans, J. Periodontol., 67: 291 - 7.
9. Junqueira, L.C. and Carneiro, J. and Kelley, R.O., 1995, Basic Histology, Ed. ke-8, Appleton and Lange, Stamford, Him. 88-117.
 10. Bergman, R.A., Afifi, A.K., Heidger, P.M., 1996, Histology, W.B. Saunders Co., Phila delphia, Him. 42-53.
 11. Madinier, I.M., Fosse, T.B., Hitzig, C, Charbit, Y. and Hannoun, L.R., 1999, Resistance profile survey of periodontal strain of Actinobacillus actinomycetemcomitans, J. Periodontol., 70: 888-
 12. Hill, R., 1981, Propolis the natural antibiotic, Ed. ke-6, Thorsons Publisher Ltd, Wellingborough.
 13. Ikeno, K., Ikeno, T., and Miyazawa, C, 1991, Effect of Propolis on Dental Caries in Rats, Caries Res., 25: 347 - 351.
 14. Kunjungiev, A., Tsvetkova, L, Serkedjieva, Y, Bankova., Christov, R. and Popov, S., 1999, Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin, J. Ethnopharmacol., 64(3): 235-40.
 15. Mirzoeva, O.K., Grishanm, R.N., and Calder, P.C, 1997, Antimicrobial Action of Propolis and Some of Components: the Effect on Growth Membrane Potential and Motility of some of Bacteria, Microbial Res., 152: 239-46.
 16. Chen, Y., 1993, Apiculture in China, pp: 96-8, Agricultural Publishing House.
 17. Kaal, J., 1991, Natural Medicine from Honey Bees (Apitherapy), Kaal's Printing House, Amsterdam, Him. 8-21.
 18. Herminajeng, E., 2001, Respon Imun Protektif Terhadap Protein Permukaan Actinobacillus actinomyte mecomitans Pada Mencit, Tesis, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
 19. The Histology Staff, 1966, Laboratory Syllabus Cell and Tissue Structure, University

- of California, School of Medicine, San Fransisco, California, Him. 59-66.
20. Soesilowati-Handogo, A.S.K., 1988, Gambaran mikroskopik ligamentum periodontale tikus (*Rattus norvegicus*) post-natal setelah radiasi dengan sinar gamma in utero, Tesis, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
 21. Scheller, S., Gazda, G., Pietsz, G., Gabrys, J.,
 22. Szumlas, J., Eckert, L. and Shani, J., 1988, The ability of ethanol extract of propolis to stimulate plaque formation in immunized mouse spleen cells, *Pharmacol. Res. Commu.*,20(4): 323 -
 23. Ghisalberti, EX., 1979, Propolis: A Review, Annual Report of the International Bee Research Association, Western Australia, Him.59-84.
 24. Tatefuji, T, Izumi, N., Ohta, T., Arai, S., Ikeda, M. and Kurimoto, M., 1996, Isolation and Identification of Compounds from Brazilian Propolis Which Enhance Macrophage Spreading and Mobility, *Biol.Pharm.Bull.*,19(7): 966-70.
 25. Fawcett, D.W., 1994, A Textbook of Histology,Ed. ke-12, Chapman & Hall, New York, Him. 133-168.
 26. Hefti, A.F., 1993, Aspects of Cell Biology of the Normal Periodontium, *Periodontol.* 2000,3:64-75.
 27. Mitchell, R.N and Cotran, R.S., 1997, Acute and Chronic Inflammation, dalam V. Kumar, R.S.Cotran and S.L.Robbins: *Basic Pathology*, 6 th ed., W.B. Saunders Co., Philadelphia.
 28. Spector, W.G and Spector, T.D., 1989, An Introduction to General Pathology, Ed. ke-3, terj. oleh: Soetjipto, Haryoso, A. Hana and P. Astuti, GMU Press, Yogyakarta, Him. 71-165.
 29. Socransky, S.S. and Haffajee, A.D., 1991, Microbial mechanisms in the pathogenesis of destructive periodontal diseases; a critical assesment, *J. Periodont. Res.*, 26: 195-212.

30. Saptoyono, B., 1995, Pengaruh aplikasi lokal getah pisang pada penyembuhan luka pasca pencabutan gigi marmot, Tesis, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
31. Root, A.I., 1983, The ABC and XYZ of bee culture, The A.I. Root Company., Ohio, Him. 539-41.
32. Saglie, F.R., Simon, K., Merrill, J. and Koeffler, H.P., 1990, Lipopolysaccharide from *Actinobacillus actinomycetemcomitans* stimulates macrophages to produce interleukin-1 and tumor necrosis factor mRNA and protein, *Oral Microbiol. Immunol.*, 5: 256 - 62.
33. Susilowati, H., 2001, Pengaruh Stimulasi Lipopolisakarida Bakteri Gram Negatif Terhadap Pasi-0 dan 1 Sel Fibroblas Ligamen Periodontal dan Gingiva Tikus, Tesis, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.