



**PENGARUH PEMBERIAN FLAVONOID PROPOLIS LEBAH TERHADAP
PROLIFERASI FIBROBLAS PASCA INSISI FLAP GINGIVA
PADA TIKUS GALUR WISTAR JANTAN**

(Penelitian Eksperimental Laboratoris)

SKRIPSI

diajukan guna melengkapi tugas akhir dan memenuhi salah satu syarat
untuk menyelesaikan Program Studi Kedokteran Gigi (S1)
dan mencapai gelar Sarjana Kedokteran Gigi

Asal :	Hadiah Pembelian	Klass 615.882
Tarik	07 APR 2009	ALI
Oleh :		P

ALI TAQWIM
NIM 041610101082

FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI
UNIVERSITAS JEMBER

2009

PERSEMBAHAN

Dengan penuh cinta, skripsi ini kupersembahkan...

untuk Ibunda Hj. Sariyem dan Ayahanda H. Yusman beserta keluarga besarku yang selalu memberikan kasih sayang, semangat dan doa restunya;

untuk guru-guru terbaikku yang telah memberikan ilmu dan pengetahuan yang tak terhingga serta kesabaran dalam membimbingku selama ini;

untuk almamaterku Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember yang telah memberikan pelajaran hidup berharga hingga saat ini.”

MOTTO

"Dari perut lebah itu keluar minuman (madu) yang bermacam-macam warnanya, di dalamnya terdapat obat yang menyembuhkan bagi manusia.

Sesungguhnya pada demikian itu benar-benar terdapat tanda (kebesaran Tuhan) bagi orang-orang yang memikirkan. [S. An Nahl: 69]"

*" tanpa mimpi dan semangat, manusia akan mati...
bermimpilah karena Tuhan akan memeluk mimpi-mimpi kita "*

_____ Arsal , the Inspirator of my life

ANDREA HIRATA

PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan dibawah ini:

Nama : Ali Taqwim

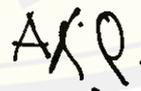
NIM : 041610101082

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya tulis ilmiah yang berjudul: *Pengaruh Pemberian Flavonoid Propolis Lebah terhadap Proliferasi Fibroblas Pasca Insisi Flap Gingiva pada Tikus Galur Wistar Jantan (Penelitian Eksperimental Laboratoris)* adalah benar-benar hasil karya sendiri, kecuali jika dalam pengutipan substansi disebutkan sumbernya dan belum pernah diajukan pada institusi manapun, serta bukan karya tulis jiplakan. Saya bertanggung jawab atas keabsahan dan kebenaran isinya sesuai dengan sikap ilmiah yang harus dijunjung tinggi.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya, tanpa adanya tekanan dan paksaan dari pihak mana pun serta bersedia mendapat sanksi akademik jika ternyata dikemudian hari pernyataan ini tidak benar.

Jember, 22 Januari 2009

Yang menyatakan,



Ali Taqwim

NIM. 041610101082

SKRIPSI

**PENGARUH PEMBERIAN FLAVONOID PROPOLIS LEBAH TERHADAP
PROLIFERASI FIBROBLAS PASCA INSISI FLAP GINGIVA
PADA TIKUS GALUR WISTAR JANTAN**

(Penelitian Eksperimental Laboratoris)

Oleh:

**ALI TAQWIM
NIM 041610101082**

Pembimbing

Dosen Pembimbing Utama : drg. Zainul Cholid, Sp. BM

Dosen Pembimbing Anggota : drg. Hengky B. Ardhiyanto

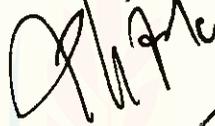
PENGESAHAN

Skripsi berjudul *Pengaruh Pemberian Flavonoid Propolis Lebah terhadap Proliferasi Fibroblas Pasca Insisi Flap Gingiva pada Tikus Galur Wistar Jantan (Penelitian Eksperimental Laboratoris)* telah diuji dan disahkan oleh Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember pada:

hari : Kamis
tanggal : 22 Januari 2009
tempat : Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember

Tim Penguji

Ketua, ~



drg. Zainul Cholid, Sp. BM
NIP. 132 206 086

Anggota



drg. Hengky B. Ardhiyanto
NIP. 132 315 512

Sekretaris

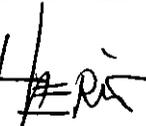


drg. Winny Adriatmoko, M. Kes
NIP. 131 417 213

Mengesahkan,

Dekan Fakultas Kedokteran Gigi

Universitas Jember



drg. Hj. Hemiyati, M. Kes
NIP. 131 479 783

RINGKASAN

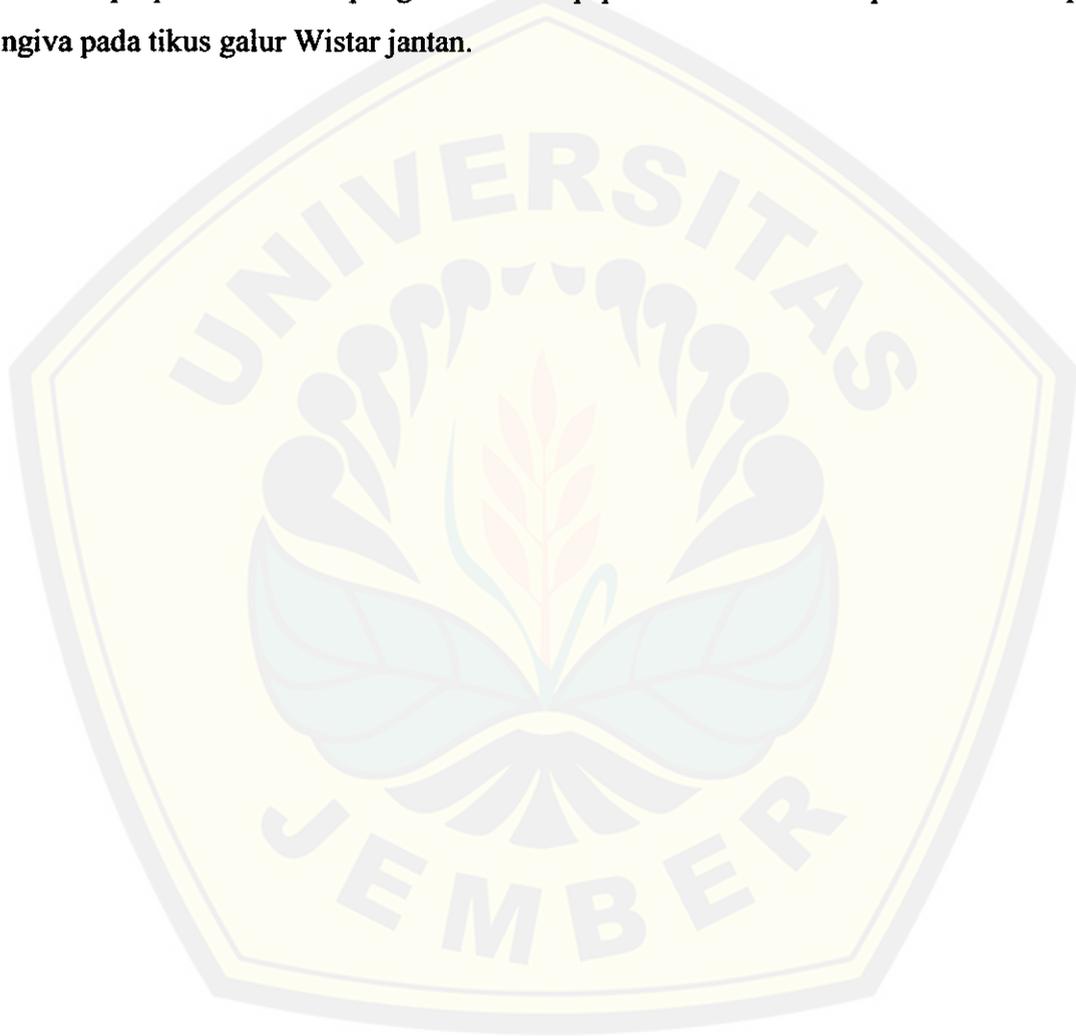
Pengaruh Pemberian Flavonoid Propolis Lebah Terhadap Proliferasi Fibroblas Pasca Insisi Flap Gingiva Pada Tikus Galur Wistar Jantan (Penelitian Eksperimental Laboratoris); Ali Taqwim, 041610101082, 2008: 62 halaman; Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.

Penyembuhan luka merupakan proses penggantian jaringan yang rusak atau mati oleh jaringan yang baru. Dalam proses penyembuhan luka, sel utama yang terlibat adalah fibroblas. Proliferasi fibroblas pada tahap awal penyembuhan luka mengindikasikan adanya proses penyembuhan yang berlangsung secara cepat. Propolis lebah memiliki kandungan flavonoid tinggi yang dapat berperan pada fase proliferasi sel selama proses penyembuhan jaringan luka dengan meningkatkan proses mitogenesis, interaksi sel serta adhesi molekul.

Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui pengaruh pemberian flavonoid propolis lebah secara per oral terhadap proliferasi fibroblas pasca insisi flap gingiva pada tikus galur Wistar jantan.

Jenis penelitian ini adalah penelitian eksperimental laboratoris dengan rancangan *the posttest only control design group*. Empat puluh ekor tikus galur Wistar (*Rattus norvegicus*) jantan umur \pm 2-3 bulan dengan berat badan \pm 200 gram dilakukan insisi flap gingiva pada gingiva anterior di bawah insisif sentralis rahang bawah dengan bentuk *triangular flap*. Subjek penelitian dibagi menjadi 2 kelompok yaitu kelompok kontrol yang diberi 1 mL *aquadest* per oral dan kelompok perlakuan yang diberi flavonoid propolis per oral sebanyak \pm 0,09 g/kg BB/hari dalam 1 mL *aquadest*. Setiap kelompok dibagi menjadi 4 sub kelompok. Masing-masing sub kelompok terdiri dari 5 ekor tikus sesuai periode dekapitasi yaitu hari ke-1, 3, 7 dan 15 pasca insisi flap gingiva. Jaringan luka dibuat preparat histologis melalui pewarnaan *Haematoxilyn Eosin* (HE) untuk mengetahui proliferasi fibroblas dengan menghitung sel fibroblas.

Analisis statistik *ANOVA* dua arah membuktikan adanya perbedaan yang bermakna ($p < 0,05$) pada setiap periode dekapitasi (hari), kelompok dan interaksi diantara keduanya. Pada uji beda *LSD* menunjukkan bahwa hampir semua berbeda bermakna ($p < 0,05$). Dari hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa pemberian flavonoid propolis lebah berpengaruh terhadap proliferasi fibroblas pasca insisi flap gingiva pada tikus galur Wistar jantan.



PRAKATA

Puji syukur penulis panjatkan ke hadirat Allah SWT atas segala rahmat dan karunia-Nya, sehingga penulis dapat menyelesaikan Skripsi yang berjudul *Pengaruh Pemberian Flavonoid Propolis Lebah terhadap Proliferasi Fibroblas Pasca Insisi Flap Gingiva pada Tikus Galur Wistar Jantan (Penelitian Eksperimental Laboratoris)*. Skripsi ini disusun untuk memenuhi salah satu syarat untuk menyelesaikan pendidikan strata satu (S1) Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.

Penyusunan Skripsi ini dapat terselesaikan atas bantuan dari berbagai pihak, oleh karena itu penulis ingin menyampaikan ucapan terima kasih kepada:

1. drg. Herniyati, M.Kes selaku Dekan Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember yang telah berkenan memberikan kesempatan bagi penulis hingga terselesaikan Skripsi ini.
2. drg. Zainul Cholid, Sp. BM selaku Dosen Pembimbing Utama dan drg. Hengky B. Ardhiyanto selaku Dosen Pembimbing Anggota, yang dengan sabar membimbing dan memberikan petunjuk dalam penulisan Skripsi ini.
3. drg. Winny Adriatmoko, M.Kes selaku sekretaris penguji yang telah banyak memberikan masukan dalam menyempurnakan penulisan Skripsi ini.
4. drg. Atik Kurniawati, M. Kes dan drg. Supriyadi, M.Kes selaku dosen wali.
5. drg Yuliana Mahdiah Daat Arina, M.Kes; drg. Banun Kusumawardani, M.Kes; drg.Yani Corvianindya R, M. KG; drg. Rudy Joelijanto, M. Biomed; dan drg Pudjiana Endah Lestari, M.Kes selaku guru dan mentor terbaik, terima kasih telah memberikan banyak waktu, dorongan semangat dan pelajaran berharga.
6. Pihak IM-HERE Universitas Jember selaku pemberi bantuan beasiswa dana penelitian, terimakasih atas kepercayaan yang telah diberikan.

7. Emak dan Bapak, terima kasih atas segala pengorbanan, cinta kasih, dorongan semangat, nasehat dan doa restunya. Aku berjanji, peluh kalian tidak akan pernah sia-sia menetes.
8. Kakak-kakakku beserta keluarga besar, terima kasih atas dukungan dan bantuannya selama ini. Keluarga Mas Sasmiriyanto, yang telah banyak memberikan waktunya untuk kelancaran studiku hingga saat ini.
9. Ibu Yana dan Mbak Nung terima kasih telah sabar mendewasakanku di Jember.
10. Teman-teman seperjuangan Skripsi Laskar Lebah (Donna, Sulé, mbak Ratih, Asih dan mbak Erni) terima kasih atas bantuan dan kerjasamanya. Semoga tetap terjaga dengan baik.
11. Mas Agus, Mbak Wahyu dan Teknisi Laboratorium Biologi Farmasi, terima kasih atas bantuan tenaga dan pikiran selama penelitian berlangsung.
12. Pak Rudy "Selecta-Malang", terima kasih atas bantuan yang tak terhingga yang memberikan propolis lebahnya untuk dijadikan bahan penelitian ini.
13. Sahabat-sahabatku Nanique, Hawa, Ria, Rosyid, Lechi, Udi, Dina, Elyda, Ratieh, Mellyna, Marvik, Esty, Jelantik, Ibad, Poki dan seluruh teman-teman angkatan 2004. Terima kasih atas bantuan dan kerjasamanya selama ini. Canda tawa, perih sedih dan kebersamaan selama ini semoga tetap terjaga.
Love you all, guys!!
14. Terima kasih untuk semua pelajaran hidup yang telah ALLAH berikan kepadaku. Aku akan terus belajar! *do something is better than do nothing!!!*

Harapan penulis semoga karya tulis ini memberikan manfaat bagi pembaca dan memberikan informasi serta pengetahuan baru bagi khasanah ilmu Kedokteran Gigi demi kemajuan ilmu pengetahuan dan teknologi.

Jember, 22 Januari 2009

Penulis

DAFTAR ISI

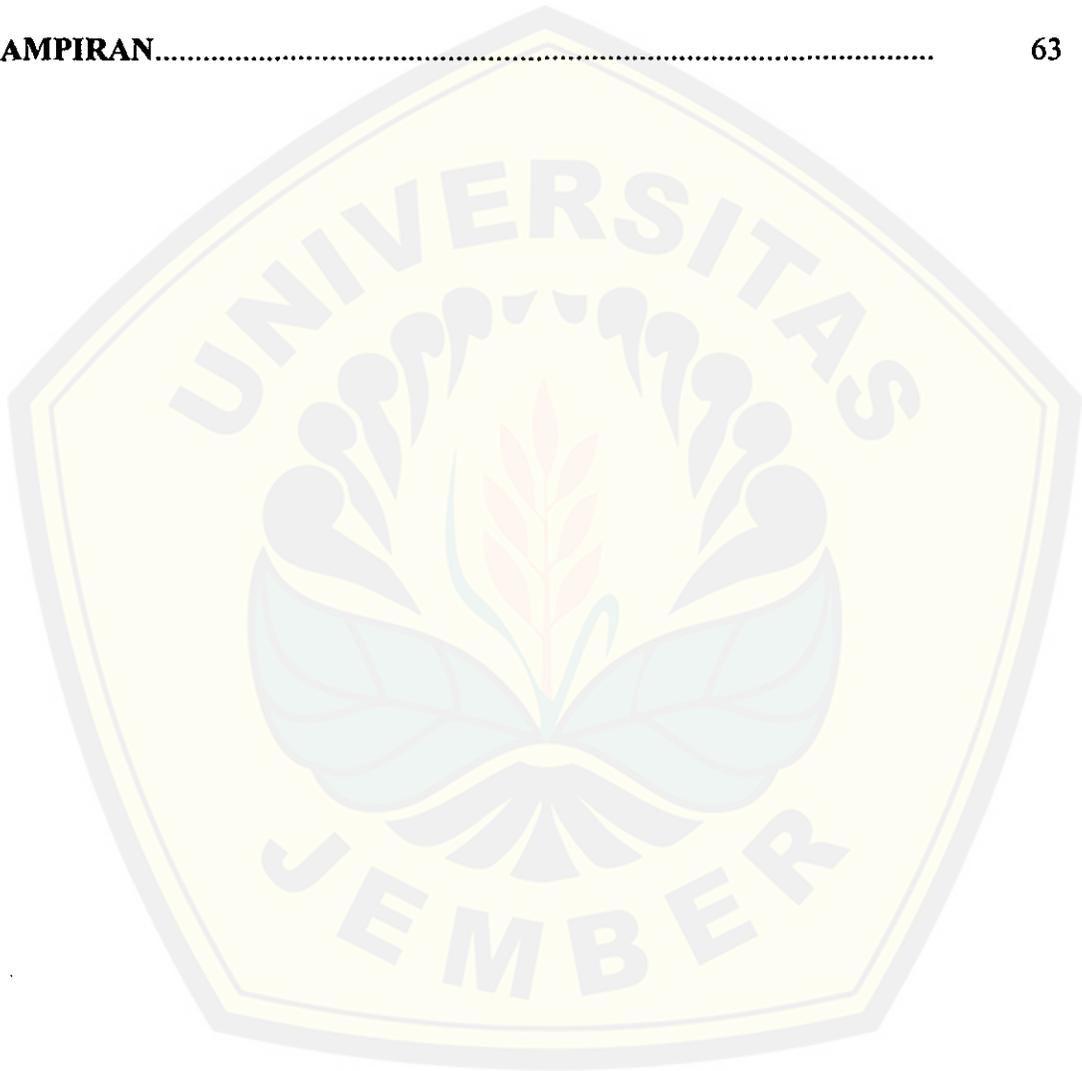
	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PERSEMBAHAN	ii
HALAMAN MOTO	iii
HALAMAN PERNYATAAN	iv
HALAMAN PEMBIMBINGAN	v
HALAMAN PENGESAHAN	vi
RINGKASAN	vii
PRAKATA	ix
DAFTAR ISI	xi
DAFTAR TABEL	xv
DAFTAR GAMBAR	xvi
DAFTAR LAMPIRAN	xviii
BAB 1. PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Tujuan Penelitian	3
1.4 Manfaat Penelitian	4
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 Propolis	5
2.1.1 Definisi Propolis	5
2.1.2 Sifat Fisik Propolis.....	6
2.1.3 Kandungan Kimia Propolis.....	7
2.1.4 Manfaat Propolis.....	8
2.2 Flavonoid	9
2.2.1 Definisi, Struktur, dan Biosintesis Flavonoid.....	9

2.2.2 Aktivitas Biologis dan Toksisitas Flavonoid	9
2.2.3 Kandungan Flavonoid dalam Propolis	10
2.3 Flap Gingiva	11
2.4 Penyembuhan Luka	12
2.4.1 Klasifikasi Penyembuhan Luka	13
2.4.2 Fase Penyembuhan Luka	14
2.4.3 Faktor yang Mempengaruhi Penyembuhan Luka	16
2.5 Fibroblas	17
2.5.1 Definisi Fibroblas.....	17
2.5.2 Struktur Fibroblas	18
2.5.3 Fungsi Fibroblas.....	19
2.5.4 Peran Fibroblas pada Proses Penyembuhan Luka	19
BAB 3. METODE PENELITIAN	
3.1 Jenis Penelitian	22
3.2 Rancangan Penelitian	22
3.3 Waktu dan Tempat Penelitian	22
3.3.1 Waktu Penelitian	22
3.3.2 Tempat Penelitian	22
3.4 Identifikasi Variabel Penelitian	23
3.4.1 Variabel Bebas	23
3.4.2 Variabel Tergantung	23
3.4.3 Variabel Terkendali	23
3.4.4 Variabel Tak Terkendali	23
3.5 Definisi Operasional Penelitian	24
3.5.1 Flavonoid Propolis Lebah	24
3.5.2 Insisi Flap Gingiva	24
3.5.3 Fibroblas	24
3.5.4 Proliferasi Fibroblas	24

3.6 Populasi dan Sampel Penelitian.....	24
3.6.1 Populasi Penelitian.....	24
3.6.2 Sampel Penelitian.....	25
3.7 Alat dan Bahan Penelitian	26
3.7.1 Alat Penelitian.....	26
3.7.2 Bahan Penelitian	27
3.8 Konversi Perhitungan Dosis.....	28
3.8.1 Penentuan Dosis Flavonoid.....	28
3.8.2 Penentuan Dosis Ketamin.....	29
3.9 Prosedur Penelitian.....	29
3.9.1 Tahap Persiapan	29
3.9.2 Tahap Pengelompokan Sampel.....	31
3.9.3 Tahap Pembuatan Insisi Flap Gingiva	32
3.9.4 Tahap Pemberian Flavonoid Propolis Lebah.....	33
3.9.5 Tahap Preparasi Jaringan	34
3.9.6 Tahap Pembuatan Sediaan Preparat.....	34
3.9.7 Tahap Pengecatan <i>Hematoxylin Eosin</i>	36
3.10 Pengamatan Histologis Proliferasi Fibroblas.....	37
3.11 Analisis Data.....	37
3.12 Alur Penelitian	38
 BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN	
4.1 Hasil Penelitian.....	39
4.1.1 Data Penelitian.....	39
4.1.2 Analisis Data.....	41
4.1.3 Foto Mikroskopik Sel Fibroblas	44
4.1.4 Analisis Kimia Ekstrak Propolis Lebah.....	47
4.2 Pembahasan.....	47

BAB 5. SIMPULAN DAN SARAN

5.1 Simpulan	55
5.2 Saran	55
DAFTAR PUSTAKA	56
LAMPIRAN	63



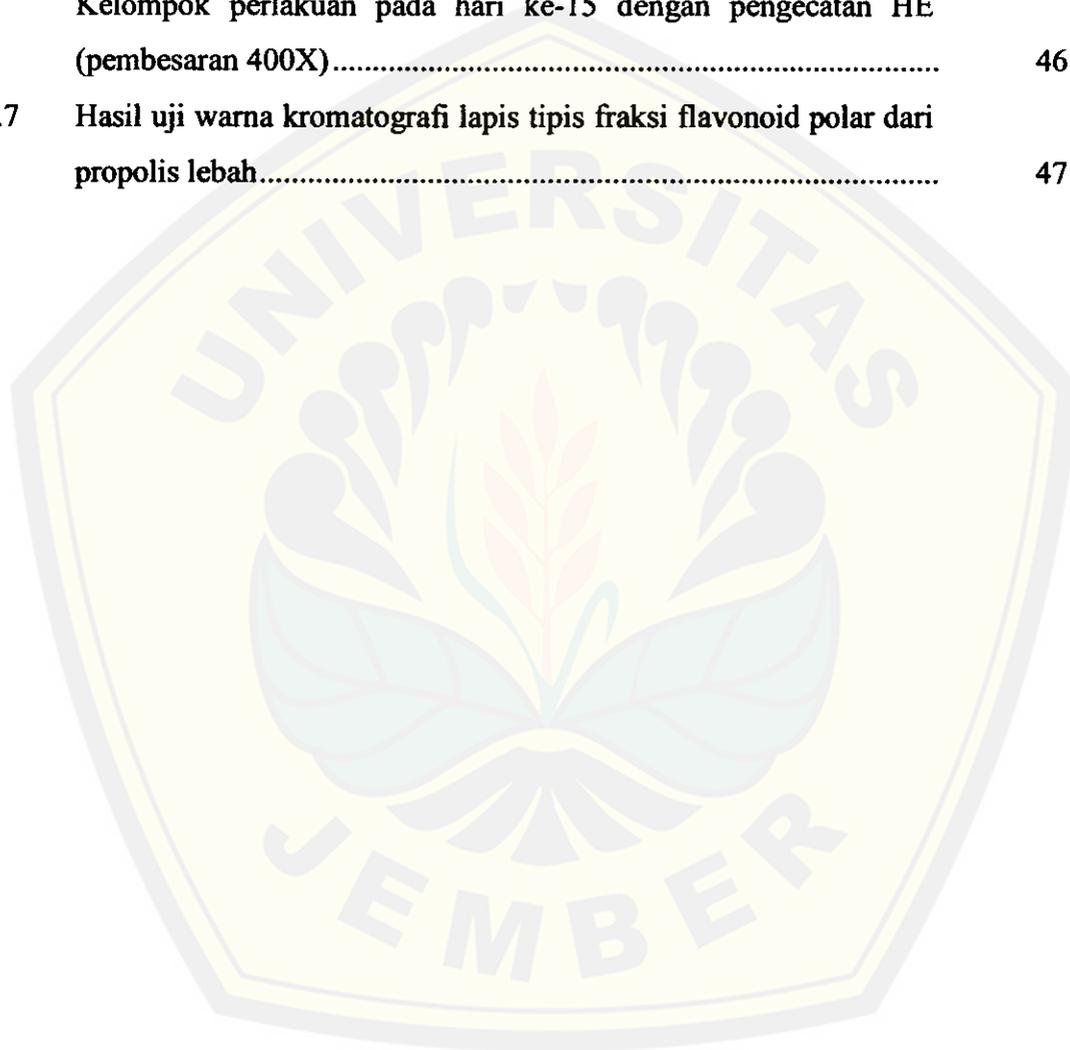
DAFTAR TABEL

	Halaman
2.1 Persentase komposisi propolis	7
3.1 Pencirian senyawa flavonoid pada kromatografi lapis tipis berdasarkan perubahan warna pada bercak noda hasil totolan pada lempeng silika setelah diuapi amonia	31
3.2 Larutan fiksasi, dehidrasi, clearing dan impregnasi.....	34
3.3 Proses pengecatan sediaan histologis.....	36
4.1 Hasil perhitungan rata-rata jumlah fibroblas antara kelompok kontrol dan perlakuan pada hari ke-1, 3, 7, dan 15.....	39
4.2 Hasil uji normalitas <i>Kolmogorov-smirnov test</i> jumlah fibroblas antara kelompok kontrol dan perlakuan.....	41
4.3 Hasil uji homogenitas <i>Levene test</i> jumlah fibroblas antara kelompok kontrol dan perlakuan	41
4.4 Hasil uji <i>ANOVA</i> dua arah antara pengaruh pemberian per oral flavonoid propolis lebah dan hari dekapitasi terhadap jumlah sel fibroblas	42
4.5 Hasil uji beda LSD pada parameter hari dekapitasi.....	43
4.6 Hasil uji beda LSD pada parameter kelompok* hari.....	43

DAFTAR GAMBAR

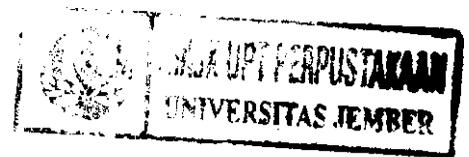
	Halaman
2.1 (A) Propolis digunakan sebagai pelindung sarang lebah terhadap benda-benda asing dari luar (B) Propolis mentah.....	5
2.2 Flap. (A) Garis tebal yang terletak menyusuri tulang adalah periosteum. (B) Flap mukoperiosteal (<i>full thicknes</i>) dan (C) Flap mukosa (<i>partial thicknes</i>)	12
2.3 Tiga fase penyembuhan luka yang terjadi saling overlap: fase-fase tersebut adalah; (A) Inflamasi, (B) Proliferasi, dan (C) Remodeling.....	14
2.4 Struktur mikroskopis fibroblas pada jaringan ikat longgar dengan pengecatan HE (pembesaran sedang)	18
3.1 Desain pembuatan insisi <i>triangular flap</i>	33
3.2 Letak penjahitan pada flap	33
4.1 Histogram rata-rata jumlah fibroblas antara kelompok kontrol dan perlakuan pada hari ke-1, 3, 7, dan 15	40
4.2 Foto daerah pengamatan di bawah mikroskop. (A) Jaringan keras gigi. (B) Daerah insisi flap gingiva. (C) Daerah pengamatan proliferasi fibroblas.....	44
4.3 Foto mikroskopik sel fibroblas. (A) Kelompok kontrol dan (B) Kelompok perlakuan pada hari ke-1 dengan pengecatan HE (pembesaran 400X).....	45
4.4 Foto mikroskopik sel fibroblas. (A) Kelompok kontrol dan (B) Kelompok perlakuan pada hari ke-3 dengan pengecatan HE (pembesaran 400X).....	45

4.5	Foto mikroskopik sel fibroblas. (A) Kelompok kontrol dan (B) Kelompok perlakuan pada hari ke-7 dengan pengecatan HE (pembesaran 400X).....	46
4.6	Foto mikroskopik sel fibroblas. (A) Kelompok kontrol dan (B) Kelompok perlakuan pada hari ke-15 dengan pengecatan HE (pembesaran 400X).....	46
4.7	Hasil uji warna kromatografi lapis tipis fraksi flavonoid polar dari propolis lebah.....	47



DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
A. Penghitungan besar sampel.....	63
B. Foto alat penelitian.....	64
C. Foto bahan penelitian.....	66
D. Tabel konversi dosis (Tabel <i>Laurence-Bacharach</i>).....	68
E. Penghitungan dosis anastesi ketamin.....	69
F. Foto tahap pelaksanaan penelitian.....	70
G. Makanan standar tikus.....	72
H. Hasil penghitungan jumlah sel fibroblas.....	73
I. Analisis data penelitian.....	76
J. Surat ijin penelitian.....	80



BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Rongga mulut sebagai bagian integral tubuh, sering mengalami trauma dalam melakukan fungsinya yang pada akhirnya dapat menimbulkan luka pada mukosa rongga mulut (Rachmawati, *et al.*, 2006:1; Ismardianita *et al.*, 2003:75). Trauma tersebut dapat disebabkan oleh benda tajam atau tumpul yang dapat merusak sebagian jaringan tubuh (Sjamsuhidajat & de Jong, 1997:72). Salah satu jenis trauma yang disebabkan oleh benda tajam dalam bidang medis adalah tindakan pembedahan.

Dalam bidang kedokteran gigi sering dilakukan tindakan pembedahan, misalnya bedah preprostetik, operasi periodontal, pencabutan gigi, odontektomi, dan perawatan di bidang endodonsia yang memerlukan perawatan prosedur bedah. Pada dasarnya setiap prosedur bedah selalu melibatkan proses insisi untuk pembuatan flap (Howe, 1995:56; Pedersen, 1996:49). Pembuatan insisi flap ini akan menyebabkan rusaknya jaringan tubuh yang selanjutnya akan pulih kembali melalui proses penyembuhan luka.

Penyembuhan luka bedah bergantung pada kemampuan perbaikan jaringan ikat. Proses penyembuhan luka diawali dengan proses inflamasi diikuti proses fibroplasia, kemudian remodeling jaringan dan pembentukan jaringan parut. Setelah proses inflamasi berkurang, dilanjutkan dengan proses fibroplasia tahap awal yaitu migrasi dan proliferasi fibroblas di daerah jejas. Pada hari ke-3, sejumlah fibroblas muda terlokalisir pada daerah jejas (Carranza, 2002:752). Fibroblas dalam jaringan berpindah dari tepi luka sepanjang benang-benang fibrin di luka (Sabiston, 1995:147). Sintesis kolagen oleh fibroblas dimulai relatif awal pada proses penyembuhan yaitu pada hari ke 3-5 dan berlanjut terus sampai beberapa minggu

tergantung ukuran luka (Kumar *et al.*, 2005:110). Selanjutnya proses penyembuhan luka memasuki fase remodeling pada hari ke-14 (Rachmawati *et al.*, 2006:7).

Dalam proses penyembuhan luka, sel utama yang terlibat adalah fibroblas (Junqueira *et al.*, 1998:119). Fibroblas merupakan elemen selular yang banyak ditemukan pada jaringan ikat gingiva yang berproliferasi dan aktif mensintesis komponen matriks pada proses penyembuhan luka dan perbaikan jaringan yang rusak (Fawcett, 2002:132). Fibroblas merupakan bahan dasar pembentukan jaringan parut dan kolagen yang memberikan kekuatan daya rentang pada penyembuhan luka jaringan lunak (Robbins & Kumar, 1995:59). Pada saat jaringan mengalami peradangan, maka fibroblas akan segera bermigrasi ke arah luka, berproliferasi dan memproduksi matriks kolagen untuk memperbaiki jaringan yang rusak (Purnami, 2003:75).

Obat-obatan dan biaya untuk memulihkan dan mempertahankan kesehatan khususnya yang berhubungan dengan penyembuhan luka, saat ini dirasakan relatif mahal. Di samping itu, dengan adanya resistensi antibiotika pada bakteri dan efek samping yang berat pada beberapa obat-obatan sintesis menjadi alasan tersendiri untuk mengalihkan perhatian pada terapi alternatif (Ernawati, 2001:473). Salah satu bahan alami sebagai terapi biologis alternatif yang diketahui aman dan pilihan yang efektif adalah propolis (Galvao *et al.*, 2007:43).

Propolis adalah substansi lengket yang dihasilkan lebah dengan cara mengumpulkan resin-resin dari berbagai macam tumbuhan dari tunas daun dan kulit batang yang dibawa ke sarang lebah dan menghasilkan sejenis lem yang digunakan untuk menutupi keretakan sarang dan pelindung terhadap gangguan dari luar (Almas *et al.*, 2001:45). Propolis merupakan bahan alami yang memiliki banyak manfaatnya bagi kesehatan. Salah satu manfaat propolis adalah sebagai bahan yang dapat mempercepat regenerasi jaringan pada proses penyembuhan luka (Krell, 1996:1). Kemampuan propolis ini berasal dari kandungan flavonoid yang tinggi (Dharmayanti *et al.*, 2000:42). Flavonoid dalam propolis dapat meningkatkan proses mitogenesis,

interaksi sel serta adhesi molekul yang sangat berperan pada fase proliferasi sel terhadap proses penyembuhan jaringan luka (Ernawati, 2001:475).

Penggunaan propolis di bidang kedokteran gigi baru dilaporkan beberapa tahun terakhir. Hasilnya menunjukkan bahwa propolis dapat digunakan sebagai salah satu bahan pengobatan alternatif dalam bidang kedokteran gigi yaitu; dalam perawatan penyakit gingivitis, mengobati ulserasi pada rongga mulut, mencegah terjadinya karies gigi, meningkatkan aktivitas mineralasi pada permukaan email gigi, perawatan ganggren pulpa serta periodontitis, dan penyembuhan luka pasca ekstraksi gigi (Sabir, 2005^a:78). Namun, penelitian untuk mengetahui pengaruh flavonoid propolis lebah terhadap proses penyembuhan luka pasca insisi flap gingiva dengan indikator proliferasi fibroblas belum pernah dilakukan.

Bertitik tolak dari uraian di atas, maka penulis tertarik untuk mengkaji lebih dalam mengenai manfaat propolis di bidang kedokteran gigi dengan melakukan penelitian tentang pengaruh pemberian flavonoid propolis lebah pada proses penyembuhan luka pasca insisi flap gingiva dengan indikator proliferasi fibroblas.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan uraian latar belakang di atas, maka timbul suatu permasalahan *“bagaimana pengaruh pemberian flavonoid propolis lebah terhadap proliferasi fibroblas pasca insisi flap gingiva pada tikus galur Wistar jantan”*.

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

Tujuan umum dari penelitian ini adalah untuk menganalisis pengaruh pemberian flavonoid propolis lebah terhadap proliferasi fibroblas pasca insisi flap gingiva pada tikus galur Wistar jantan.

1.3.2 Tujuan Khusus

- a. Mengetahui proliferasi fibroblas pasca insisi flap gingiva pada tikus galur Wistar jantan yang diberi flavonoid propolis lebah.
- b. Membandingkan proliferasi fibroblas pasca insisi flap gingiva pada tikus galur Wistar jantan pada kelompok perlakuan dengan kontrol.

1.4 Manfaat Penelitian

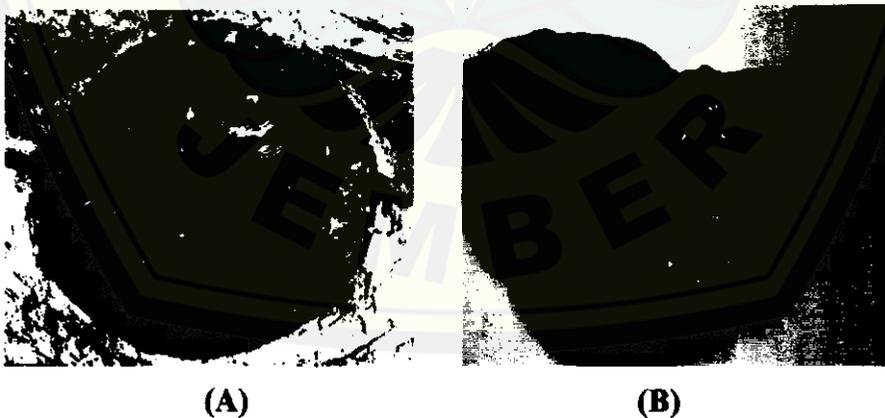
1. Memberikan informasi tentang penggunaan flavonoid propolis lebah terhadap proliferasi fibroblas pada proses penyembuhan luka pasca insisi flap gingiva.
2. Memberikan sumbangan pemikiran dan bukti ilmiah bahwa flavonoid propolis lebah dapat digunakan sebagai terapi yang mempercepat penyembuhan luka pasca insisi flap gingiva.
3. Sebagai dasar penelitian lebih lanjut.

BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Propolis

2.1.1 Definisi Propolis

Propolis adalah material lengket berwarna gelap yang dikumpulkan oleh lebah dari berbagai jenis tumbuhan, dicampur dengan lilin lebah (*wax*) dan digunakan untuk membangun konstruksi sarang lebah (Gambar 2.1) (Bankova *et al.*, 2000:3). Kata “propolis” berasal dari bahasa Yunani, yaitu *pro* (pertahanan depan, sebelum masuk) dan *polis* (kota), yang secara umum bermakna pertahanan kota atau sarang lebah dari benda-benda di luar sarang (Bankova *et al.*, 2000:3; Scully, 2006:359). Propolis merupakan substansi resin alami yang merupakan campuran lilin lebah (*wax*), gula dan eksudat tanaman atau getah (Scully, 2006:359). Getah yang menjadi bahan dasar propolis ini berasal dari bagian tumbuhan penghasil getah yaitu kulit kayu, tunas, *wax*, dan pucuk-pucuk daun (de Almada & Menezes, 2002:6).



Gambar 2.1 (A) Propolis digunakan sebagai pelindung sarang lebah terhadap benda-benda asing dari luar. (B) Propolis mentah.

Sumber: (A) Krell, 1996:1; (B) Sisa, 1996

Lebah madu (*Apis mellifera L.*) mengumpulkan resin-resin dari berbagai macam tumbuhan yaitu getah yang keluar dari kuncup daun dan kulit batang tanaman *conifer* (golongan pinus). Lebah kemudian membawa resin tersebut menuju sarang lebah dan mencampur dengan enzim yang disekresikan dari kelenjar mandibula lebah, meskipun demikian komponen yang terdapat di dalam propolis tidak mengalami perubahan (Farre *et al.*, 2004:22).

Produksi propolis per koloni per tahun diperkirakan antara 10-300 gram, tetapi produksi ini tergantung jenis lebah, iklim, sumber daya hutan, dan mekanisme pengumpulan lebah. Propolis dapat langsung dimanfaatkan atau dilakukan pemurnian terlebih dahulu dengan ekstraksi dan penyaringan (Krell, 1996:16; Farre *et al.*, 2004:22).

2.1.2 Sifat Fisik Propolis

Propolis merupakan suatu substansi resin yang bentuknya lengket seperti lem, lembut dan liat pada suhu 25°-45°C. Pada suhu kurang dari 15°C dan secara partikuler ketika dibekukan atau didekatkan pada pendingin, propolis akan berubah menjadi keras dan rapuh. Propolis akan tetap rapuh meskipun telah dilakukan pemanasan dengan suhu yang lebih tinggi. Pada suhu di atas 45°C propolis akan menjadi lebih lengket dan lebih liat. Propolis secara khas akan mencair pada suhu 60°-70°C, meskipun beberapa propolis titik leburnya mencapai 100°C (Krell, 1996:2).

Variasi warna, komposisi dan khasiat propolis dapat terjadi karena sumber tanaman yang bermacam-macam. Propolis berwarna kuning sampai coklat gelap, bahkan transparan tergantung dari resin asalnya (Krell, 1996:2). Selain itu propolis juga secara umum bersifat tidak beracun, meskipun telah dilaporkan adanya reaksi alergi, tetapi reaksi ini biasanya hanya sebatas kemerahan pada kulit (de Almida & Menezes, 2002:6).

2.1.3 Kandungan Kimia Propolis

Propolis kaya akan zat esensial yang sangat berguna bagi manusia. Komposisi kimia propolis sangat bervariasi (warna dan aroma) dan erat hubungannya dengan jenis dan umur tumbuhan serta letak geografis asal propolis (Lotfy, 2006:22). Umumnya propolis mengandung resin dan balsam yang terdiri atas 55% flavonoid dan asam fenol dan esternya, 30% lilin lebah (*wax*), 10% etereal dan minyak aromatis, 5% *pollen* dan senyawa organik serta mineral sebesar 5% (Tabel 2.1) (Farre *et al.*, 2004:24).

Tabel 2.1 Persentase komposisi propolis

Komposisi	Persentase (%)	Kandungan
Resin	45-55	Flavonoid, asam fenol dan esternya
Lilin (<i>wax</i>)	7,5-35	Kebanyakan <i>beeswax</i>
Minyak esensial	5-10	Minyak volatil
Asam lemak	5	Kebanyakan dari lilin lebah
<i>Pollen</i>	5	Protein dan asam amino bebas (arginin dan prolin)
Senyawa Organik dan mineral	5	Keton, lakton, quinon, steroid, asam benzoat dan esternya Vitamin B ₁ , B ₂ , B ₃ , B ₆ dan gula Elemen Fe, Zn, Au, Ag, Cs, Hg, K, & Sb

Sumber : Farre *et al.*, 2004:25

Jenis senyawa kimia yang terdapat pada propolis sangat kompleks. Berdasarkan analisis kimia menggunakan metode *Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS)* yang dilakukan oleh Greenaway *et al.* (1990) terhadap propolis yang dihimpun oleh lebah dari tumbuhan poplar menunjukkan, propolis mengandung berbagai macam senyawa, yaitu: asam amino, asam alifatik dan esternya, asam aromatik dan esternya, alkohol, aldehida, khalkon, dihidrokhalkon, flavanon, flavon, hidrokarbon, keton, dan terpenoid (Sabir, 2005^a:77).

Propolis mengandung terpen, tanin, vitamin dan mineral dari sekresi kelenjar saliva lebah (Farre *et al.*, 2004:24). Vitamin yang terkandung dalam propolis adalah vitamin A, B₁, B₂, B₃, C dan E (Krell, 1996:4; Lotfy, 2006:23). Kandungan mineral propolis adalah kalsium, magnesium, zat besi, silika, potasium, fosfor, mangan, kobalt, dan tembaga (Bankova *et al.*, 2000:9; Farre *et al.*, 2004:25).

Propolis kaya akan berbagai senyawa kimia termasuk asam amino, asam sinamat, alkohol sinamil, vanilin, asam kafeat fenetil ester, tetokrisin, isalpinin pinosembrin, krisin, galangin, asam ferulat, dan senyawa bioflavonoid (flavonoid) yang terkandung dalam propolis terdiri atas sejumlah besar minyak volatil dan fenolik seperti flavon, flavonon, dan flavonol (Valcic, *et al.*, 1999:406; Yaghoubi *et al.*, 2007:46).

2.1.4 Manfaat Propolis

Bagi lebah, propolis merupakan zat penting yang sangat fundamental yang diperlukan untuk sterilisasi sarang lebah dari serangan bakteri, jamur dan penyakit. Propolis berfungsi melindungi seluruh sarang dan tempat lebah ratu menyimpan telurnya dari hama *Bacillus larvae* yang menyebabkan kebusukan telur-telurnya. Jadi, propolis tidak hanya berfungsi sebagai penyegel atau penutup sarang lebah tetapi juga menghalangi masuknya kuman penyakit (Krell, 1996:1).

Propolis digunakan oleh bangsa Yunani kuno sebagai bahan terapi untuk melindungi tubuh manusia dari serangan bakteri, virus, jamur dan radikal bebas. Propolis memiliki kemampuan farmakologi yang digunakan sebagai bahan anti-inflamasi, hepatoprotektor, antitumor atau karsinostatik, antimikroba, antivirus, antifungi, antiprotozoa, anastesi dan regenerasi jaringan (Bankova, *et al.*, 2000:4; Farre *et al.*, 2004:25; Yaghoubi *et al.*, 2007:45). Selain itu, konsumsi propolis dapat meningkatkan sistem imun (imunostimultan). Propolis secara simultan meningkatkan fungsi sistem imun dan secara langsung menghambat mikroorganisme patogen. Propolis juga telah terbukti efektif melawan *strain* bakteri yang resisten terhadap

antibiotik, hal ini didasarkan pada kandungan propolis yang kompleks (Sforcin, *et al.*, 2002:1; Taheri *et al.*, 2005:414).

2.2 Flavonoid

2.2.1 Definisi, Struktur dan Biosintesis Flavonoid

Flavonoid (bioflavonoid) merupakan suatu senyawa fenol yang tersebar luas pada hampir semua tumbuh-tumbuhan, dengan penyebaran terbesar terdapat pada golongan *angiospermae* (Sabir, 2003:81). Flavonoid merupakan kandungan khas tumbuhan hijau dengan pengecualian alga dan *hornwort* (Markham, 1988:10). Lebih dari 4.000 flavonoid telah diidentifikasi pada tumbuhan tingkat tinggi dan rendah (Sabir, 2003:81).

Flavonoid digunakan untuk menamakan golongan senyawa yang memiliki struktur kerangka dasar C₆-C₃-C₆. Setiap bagian C₆ merupakan cincin benzona yang digunakan dengan atom karbon (C₃) yang merupakan rantai alifatis yang dapat pula membentuk cincin ketiga (Sabir, 2003:82). Flavonoid dikelompokkan menjadi 6 golongan, yaitu flavon, isoflavon, flavonol, khalkon, dan antosianidin. Penggolongan flavonoid dibedakan berdasarkan susunan kimianya, yaitu perbedaan substansi cincin heterosiklik yang mengandung oksigen dan perbedaan distribusi gugus hidroksil. Perbedaan oksigenasi pada atom C₃ menentukan sifat, khasiat dan tipe/ golongan flavonoid (Sabir, 2003:82) dan flavonoid sering terdapat sebagai bentuk glikosida (Robinson, 1991:191).

2.2.2 Aktivitas Biologis dan Toksisitas Flavonoid

Penelitian secara *in vitro* menunjukkan bahwa flavonoid memiliki aktivitas biologis maupun farmakologis. Beberapa aktivitas biologis yang diketahui hingga saat ini adalah: sebagai anti-inflamasi, antibakteri, antialergi, antioksidan, dan antikarsinogen. Fungsi biologis dari flavonoid akan meningkat bila diabsorpsi, antara lain sintesis protein, diferensiasi dan proliferasi sel, serta angiogenesis (Sabir, 2003:84).

Flavonoid memberikan pengaruh besar pada efek anti-inflamasi dengan menghambat jalur komplemen klasik dan alternatif dengan penghambatan aktivitas fungsional C3. Flavonoid dapat mengurangi efek sitokin yang dihasilkan oleh makrofag dan sitokin reseptor yang secara umum akibatnya tampak pada penekanan rasa sakit dan kerusakan jaringan. Menurut penelitian Takashi (1994), flavonoid dapat menghambat induksi sel endotel oleh IL-1 dan TNF- α yang dikeluarkan oleh sel-sel yang terkena jejas, sehingga menyebabkan terhambatnya induksi produksi prostaglandin dan induksi IL-8 (Ernawati, 2001:475).

Senyawa flavonoid dalam bentuk aglikon pada usus diabsorpsi bersama-sama asam empedu dan melalui epitel masuk ke dalam peredaran darah. Melalui vena portal, sebagian besar flavonoid menuju ke hati yang merupakan organ utama tempat metabolisme flavonoid selain dinding usus besar dan ginjal. Metabolit flavonoid misalnya 3,5- dihidroksifenilasetat dan 3-hidroksifenilasetat ditemukan pada urin. Hal ini dapat dikatakan bahwa tidak ada residu flavonoid yang terakumulasi di dalam tubuh, sehingga toksisitas flavonoid sangat rendah (Sabir, 2003:84).

2.2.3 Kandungan Flavonoid dalam Propolis

Komposisi propolis bervariasi tergantung musim dan tempat propolis tersebut berasal. Di antara komponen propolis yang telah teridentifikasi, flavonoid merupakan komponen utama yang memiliki aktivitas biologis pada propolis. Flavonoid yang terkandung di dalam propolis meliputi flavon (*apigenin, chrysin*), flavonol (*galangin, kaempferol, myricetin, quercetin*), flavonon (*hesperitin, naringin, naringenin*), dan isoflavon (*daedzein, genestein*) (Fu & Wen, 2005:43). Menurut penelitian Bankova *et al.* (1999), di dalam propolis teridentifikasi bermacam-macam flavonoid yaitu; (1) *pinochembrin*, (2) *galangin*, (3) *chrysin*, (4) *tectochrisyn*, (5) *quersetin*, (6) *isorhamnetin* dan (7) *kaempferol*.

2.3 Flap Gingiva

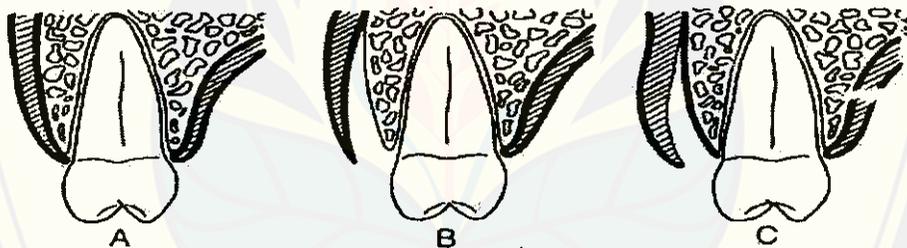
Flap merupakan suatu bagian mukosa yang secara bedah dipisahkan dari jaringan di bawahnya (Carranza, 2002:762). Tindakan ini dilakukan untuk mendapatkan jalan masuk ke struktur di bawahnya (biasanya pada tulang atau gigi) atau untuk prosedur koreksi, untuk mencapai daerah patologis, merawat luka, atau untuk memperbaiki kerusakan jaringan (Pedersen, 1996:49). Flap dibuat agar daerah operasi dapat terlihat dengan jelas dan dapat dicapai. Bentuk flap harus menjamin tersedianya lapang pandang dan jalan masuk secara mekanis yang memadai. Dasar flap harus lebih lebar dari pada bagian ujungnya yang bebas untuk mendapatkan suplai darah yang baik (Howe, 1995:56; Pedersen, 1996:50).

Pembuatan flap yang baik harus memenuhi persyaratan sebagai berikut; (a) flap didesain sedemikian rupa sehingga suplai darah dapat dipertahankan, (b) desain flap harus dibuat dengan ukuran yang memadai, sehingga dapat disingkapkan dari daerah operasi, dan (c) flap dapat menutupi lagi bagian yang tadinya terbuka, dan tidak dalam kondisi tegang pada saat dijahit pada posisinya semula (Purwanto *et al.*, 1999:7).

Flap diidentifikasi berdasarkan komposisi jaringan, lokasi, dan desain atau bentuknya. Pembuatan flap harus memperhatikan bentuk dan letak insisi pada gingiva. Bentuk dan letak insisi harus sedemikian rupa sehingga dapat menjamin penyembuhan luka dengan baik. Flap berdasarkan desain atau bentuknya dibagi menjadi flap *envelope*, flap *semilunar* dan flap *pedikel* (Pedersen, 1996:47-48). Flap *envelope* dilakukan dengan membuat insisi horizontal pada tepi gingiva, kemudian dimodifikasi seperlunya dengan melakukan insisi serong ke arah anterior (*triangular flap*). Untuk mendapatkan jalan masuk apikal yang lebih besar maka ditambahkan insisi serong di bagian posterior. Flap *semilunar* ditempatkan pada permukaan prosesus alveolaris di sebelah apikal dari pertemuan antara mukosa bergerak dan mukosa cekat. Keuntungan desain ini adalah perlekatan gingiva dan sebagian besar mukosa cekat tetap terpelihara dengan baik. Flap ini digunakan untuk menghindari tepi mahkota protesa, untuk pembedahan periradikular, dan mendapatkan jalan masuk

ke sinus maksilaris dan regio yang jauh lainnya. Flap *pedikel* dibuat pada bagian bukal, lingual atau palatal dan digunakan untuk migrasi atau transportasi untuk memperbaiki suatu cacat (Pedersen, 1996:48-49).

Berdasarkan komponen jaringan yang membentuknya atau ketebalannya, flap dibagi menjadi 2 (dua) yaitu, *full thickness flap* (berketebalan penuh) atau flap mukoperiosteal dan *partial thickness flap* (berketebalan sebagian) atau flap mukosa (Gambar 2.2). Flap mukoperiosteal terbentuk atas gingiva, mukosa, submukosa, dan periosteum. Flap ini dibentuk dengan cara memisahkan jaringan lunak dari tulang dengan pemotongan tumpul. Flap mukosa terdiri atas gingiva, mukosa, atau submukosa, tetapi tidak termasuk periosteum. Flap ini dibuat dengan insisi tajam sampai ke dekat tulang alveolar, tetapi periosteum dan jaringan ikat tetap dibiarkan melekat ke tulang dan menutupi tulang (Pedersen, 1996:48; Fedi *et al.*, 2004:144-146).



Gambar 2.2 Flap. (A) Garis tebal yang terletak menyusuri tulang adalah periosteum. (B) Flap mukoperiosteal (*full thickness*) sehingga meninggalkan tulang yang terdedah dan (C) flap mukosa (*partial thickness*) diangkat dan periosteum tetap tinggal menempel di tulang.

Sumber: Pedersen, 1996:48

2.4 Penyembuhan Luka

Penyembuhan adalah pergantian sel mati oleh sel hidup atau jaringan fibrosa dan terjadi melalui regenerasi atau organisasi, hasil akhir tergantung dari keseimbangan lokal di antara kedua faktor tersebut (Lawler *et al.*, 1992:15). Penyembuhan merupakan suatu proses terjadinya sel-sel yang hilang atau rusak diganti dengan sel-sel hidup yaitu melalui regenerasi sel parenkim atau sel fibroblas jaringan ikat pembentuk parut (Robbins & Kumar 1995:53). Luka merupakan kondisi

hilangnya sebagian jaringan tubuh dan kontinuitas jaringan rusak. Keadaan ini dapat disebabkan oleh trauma benda tajam atau tumpul, perubahan suhu, zat kimia, listrik, dan gigitan hewan (Reksoprodjo, 1995:415; Sjamsuhidajat & de Jong, 1997:72).

Penyembuhan luka merupakan proses dinamis yang meliputi unsur-unsur tubuh, pembuluh darah, matriks ekstraselular, dan sel parenkim (Singer & Clark, 1999). Pada awalnya, darah di dalam luka akan membeku, diikuti dengan respon peradangan yang membersihkan sel mati dan bakteri. Fibroblas dan pembuluh darah meluas pada fibrin di bekuan darah, kolagen ditimbun dan setelah beberapa waktu kolagen memperoleh kekuatan dari ikatan dan remodeling (Sabiston, 1995:150).

2.4.1 Klasifikasi Penyembuhan Luka

Berdasarkan luas dari jaringan yang hilang, penyembuhan luka dapat diklasifikasikan menjadi dua macam yaitu penyembuhan primer dan penyembuhan sekunder (Porth, 1994:35).

a. Penyembuhan Primer

Pada penyembuhan primer hanya sedikit atau tidak ada jaringan yang hilang. Penyembuhan segera terjadi setelah perlukaan dengan jaringan parut dan risiko infeksi yang minimal karena penyembuhan primer hanya terjadi pada jaringan yang mengalami kerusakan (Peterson *et al.*, 1998:62). Daerah luka segera terisi dengan bekuan darah yang mengandung fibrin dan sel-sel darah (Kumar *et al.*, 2005:112). Proses penyembuhan primer dapat dilihat pada penyembuhan luka gores atau insisi yang sembuh dengan baik, fraktur tulang yang tereduksi dengan baik dan reanastomi saraf pada saraf yang baru saja terputus (Peterson *et al.*, 1998:62).

b. Penyembuhan Sekunder

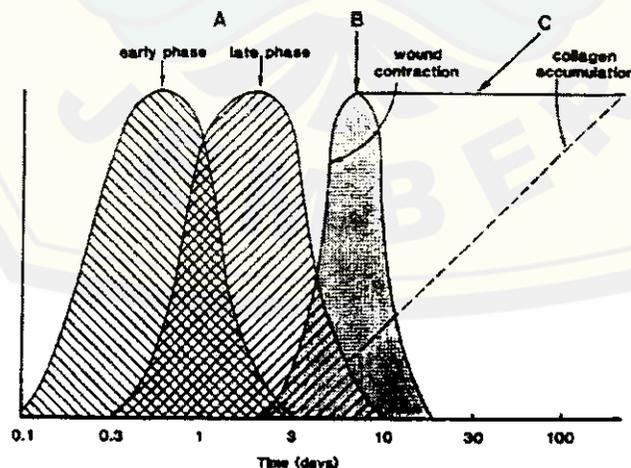
Proses penyembuhan sekunder berbeda dengan penyembuhan primer dalam beberapa hal. Pada penyembuhan sekunder, kerusakan jaringan luas dan adanya kontaminasi yang mengandung lebih banyak debris nekrotik dan eksudat yang harus dibersihkan (Porth, 1994:35; Kumar *et al.*, 2005:113). Proses penyembuhan sekunder

dapat dilihat pada penyembuhan luka yang besar misalnya; pencabutan gigi, fraktur tulang yang sulit tereduksi, ulser yang dalam, luka avulsif pada jaringan lunak (Peterson *et al.*, 1998:63) dan luka bakar (Porth, 1994:35).

Pada penyembuhan sekunder banyak terdapat jaringan granulasi yang terbentuk menimbulkan reaksi radang yang lebih kuat dan intensif (Kumar *et al.*, 2005:113). Penyembuhan luka menjadi sangat lambat dan menghasilkan lebih banyak jaringan parut dibandingkan dengan penyembuhan primer (Porth, 1994:35; Peterson *et al.*, 1998:62). Oleh sebab itu, proses penyembuhan sekunder menjadi lebih rumit (Kumar *et al.*, 2003:113).

2.4.2 Fase Penyembuhan Luka

Proses penyembuhan luka yang terjadi pada jaringan yang rusak oleh trauma dapat dibagi menjadi tiga fase yaitu fase inflamasi (radang), fase proliferasi dan fase maturasi atau remodeling. Pada luka yang mengalami penyembuhan primer, lama tiap fase dapat terprediksi dengan baik. Pada penyembuhan luka sekunder, proses ini bergantung pada banyak variabel sehingga sulit diprediksi (Porth, 1994:35). Menurut Kiritsy & Lynch (1993:730), tiga fase penyembuhan luka ini terjadi secara *overlap* (Gambar 2.3).



Gambar 2.3 Tiga fase penyembuhan luka yang terjadi saling *overlap*: fase-fase tersebut adalah (A) inflamasi, (B) proliferasi, dan (C) remodeling.

Sumber: Kiritsy & Lynch, 1993:730

a. Fase Inflamasi

Fase inflamasi berlangsung sejak terjadinya luka dan merupakan periode penting dalam mempersiapkan lingkungan sekitar luka untuk proses penyembuhan. Fase inflamasi berlangsung hingga 3 sampai 5 hari (Peterson *et al.*, 1998:59). Fase ini terdiri dari proses hemostasis, fase vaskular dan fase selular. Proses hemostasis diaktifkan segera setelah terjadi luka (Porth, 1994:35). Pada fase vaskular, terjadi vasokonstriksi awal pembuluh darah. Aliran darah akan bergerak lambat menuju daerah yang terkena jejas dan hal ini dapat meningkatkan pembekuan darah. Beberapa menit kemudian, histamin dan prostaglandin pada sel darah putih akan menyebabkan vasodilatasi pembuluh darah sehingga dinding pembuluh darah meloloskan sel plasma dan leukosit menuju jaringan interstisial (Peterson *et al.*, 1998:59).

Tanda dan gejala klinik reaksi radang menjadi jelas berupa adanya kemerahan (*rubor*) karena kapiler melebar, suhu hangat (*calor*), rasa nyeri (*dolor*), dan pembengkakan (*tumor*). Fase ini disebut juga fase lambat (*lag phase*) karena reaksi pembentukan kolagen baru sedikit dan pertautan luka pada fase ini hanya dilakukan oleh fibrin sehingga belum ada kekuatan pertautan luka (Reksoprojo, 1995:415; Sjamsuhidajat & de Jong, 1997:72; Peterson *et al.*, 1998:59).

Fase selular dipicu oleh aktivasi komplemen serum dari jaringan yang terkena jejas (Peterson *et al.*, 1998:59) yang ditandai dengan infiltrasi neutrofil yang cepat diganti oleh sel mononuklear (Macari *et al.*, 2005:25). Sel-sel radang ini keluar dari pembuluh darah secara diapedesis dan menuju daerah luka secara khemotaksis (Reksoprodjo, 1995:415).

b. Fase Proliferasi

Fase proliferasi berlangsung dari akhir fase inflamasi (biasanya hari ke-2 sampai ke-3 setelah terjadi luka) hingga akhir minggu ke-3 pada penyembuhan luka primer (Porth, 1994:35). Proses utama pada fase ini adalah pembentukan jaringan baru untuk mengisi ruang luka. Sel yang berperan penting pada fase ini adalah

fibroblas (Porth, 1994:36). Oleh sebab itu, fase ini disebut sebagai fase fibroplasia karena yang menonjol adalah proses proliferasi fibroblas (Reksoprodjo, 1995:415). Fase proliferasi ditandai dengan adanya sel mononuklear inflamatori, diikuti dengan pembentukan jaringan granulasi dan proliferasi fibroblas dan keratinosit (Macari *et al.*, 2005:25).

Pada fase ini luka dipenuhi oleh sel radang, fibroblas dan kolagen membentuk jaringan berwarna kemerahan dengan permukaan yang berbenjol halus yaitu jaringan granulasi. Proses ini baru berhenti setelah epitel saling menyentuh dan menutup seluruh permukaan luka. Pada saat tertutupnya permukaan luka, proses fibroplasia dengan pembentukan jaringan granulasi luka akan berhenti (Sjamsuhidajat & de Jong, 1997:73). Kemajuan pada fase ini adalah adanya akumulasi kolagen dan proliferasi fibroblas yang berlangsung terus menerus. Sintesis kolagen mencapai puncaknya pada hari ke-5 hingga ke-7 (Porth, 1994:36).

c. Fase Remodeling

Fase remodeling dimulai kira-kira minggu ke-3 dan dapat berlangsung berbulan-bulan (6 bulan hingga 2 tahun) tergantung dari luas luka (Porth, 1994:36) dan dinyatakan berakhir jika semua tanda radang sudah hilang (Sjamsuhidajat & de Jong, 1997:73). Pada fase ini terdapat pematangan jaringan parut akibat stimulasi sintesis kolagen oleh fibroblas dan lisisnya enzim kolagenase. Hasil akhir dari proses ini akan meningkatkan kekuatan regang luka oleh jaringan parut (Porth, 1994:36).

Pada fase ini terjadi proses pematangan yang terdiri dari penyerapan kembali jaringan yang berlebih, pengerutan sesuai dengan gaya gravitasi, dan akhirnya jaringan yang baru terbentuk. Selama proses ini dihasilkan jaringan parut yang pucat, tipis dan lemas tanpa rasa nyeri dan gatal (Sjamsuhidajat & de Jong, 1997:73).

2.4.3 Faktor yang Mempengaruhi Penyembuhan Luka

Secara umum, penyembuhan luka merupakan proses efisien yang kemajuannya sulit dihentikan. Namun, terdapat faktor-faktor yang dapat mengganggu

proses penyembuhan pada hampir setiap stadium (Spector & Spector, 1993:148). Penyembuhan luka dapat terganggu oleh penyebab dari dalam tubuh (internal) atau oleh penyebab dari luar tubuh (eksternal) (Sjamsuhidajat & de Jong, 1997:77).

Penyebab internal terpenting adalah gangguan koagulasi dan gangguan sistem imun. Semua gangguan pembekuan darah dapat menghambat penyembuhan luka sebab hemostasis merupakan titik tolak dan dasar fase inflamasi. Gangguan sistem imun akan menghambat dan mengubah reaksi tubuh terhadap luka, kematian jaringan, dan kontaminasi. Apabila sistem daya tahan tubuh, baik selular maupun humoral terganggu, maka pembersihan kontaminan dan jaringan mati serta penahanan infeksi tidak berjalan baik. Selain itu, sistem imun juga dipengaruhi oleh keadaan umum yang kurang baik pada usia lanjut dan status gizi (Sjamsuhidajat & de Jong, 1997:77). Pada penderita yang kekurangan nutrisi tidak akan mengalami penyembuhan luka secara optimal (Price & Wilson, 1994:56).

Penyebab eksternal meliputi penyinaran sinar ionisasi yang akan mengganggu mitosis dan merusak sel akibat dini maupun lanjut. Pemberian sitostatik (obat penekan reaksi imun) dan juga kortikosteroid juga akan mempengaruhi penyembuhan luka. Pengaruh setempat seperti infeksi, hematoma, benda asing, jaringan mati (Sjamsuhidajat & de Jong, 1997:77) dan imobilisasi yang tidak sempurna serta penekanan tepi luka akan menghambat proses penyembuhan luka (Price & Wilson, 1994:57).

2.5 Fibroblas

2.5.1 Definisi Fibroblas

Fibroblas (*L. fibra*, serat: Yunani. *blatos*, benih: Latin) adalah sel yang menghasilkan serat dan substansi dasar amorf jaringan ikat biasa. Pada saat sedang aktif menghasilkan substansi internal, sel ini memiliki juluran sitoplasma lebar atau tampak berbentuk kumpanan. Sitoplasmanya yang banyak bersifat basofil dan anak intinya sangat jelas, yang menandakan adanya sintesis protein secara aktif (Cormack, 1994:220). Fibroblas merupakan salah satu sel jaringan ikat dalam rongga mulut yang

paling khas dan berperan penting dalam perkembangan dan pembentukan struktur jaringan (Purnami, 2003:74).

2.5.2 Struktur Fibroblas

Fibroblas paling banyak terdapat dalam ligamen periodontal dan secara rapat memenuhi populasi, bentuknya gelondong atau *disk flat* (pipih) dan mempunyai inti yang panjang dan ovoid, serta banyak proses sitoplasmik yang panjangnya bervariasi. Struktur sitoplasmiknya berhubungan dengan fibroblas lain dalam jaringan penghubung manusia. Fibroblas membawa banyak vakuola sitoplasmik yang berisi serat-serat kolagen yang pendek dan enzim *proteolytic*, dimana bukti bahwa fibroblas juga turut serta dalam pembentukan badan serat melalui resorpsi dari kolagen yang telah dibentuk (Schroeder, 1991:215).

Fibroblas merupakan sel dengan bentuk tidak beraturan, agak gepeng dengan banyak cabang dan dari samping terlihat berbentuk gelondong atau fusiform (Gambar 2.4). Sitoplasmanya bergranula halus dan mempunyai inti lonjong, besar di tengah dengan satu atau dua anak inti jelas (Bajpai, 1989:26; Tambajong, 1995:19; Eroschenko, 2003:30).



Gambar 2.4 Struktur mikroskopis fibroblas pada jaringan ikat longgar dengan pengecatan hematoksilin-eosin. Pembesaran sedang.

Sumber: Junqueira & Carneiro, 2007:108

Pengamatan menggunakan mikroskop elektron menampakan aparat golgi secara jelas dan banyak sekali retikulum endoplasma kasar dalam fibroblas, terutama jika sel secara aktif memproduksi matrik, seperti pada proses penyembuhan luka. Aktin dan α -aktinin terletak di sekeliling sel dan miosin terdapat di seluruh sitoplasma. Fibroblas aktif lebih kecil dan lebih ovoid serta mempunyai sitoplasma asidofilik, nukleus lebih kecil, memanjang, dan lebih berwarna gelap (Gartner & Hiatt, 2001:42).

2.5.3 Fungsi Fibroblas

Fibroblas adalah sel yang paling banyak terdapat dalam jaringan ikat, berfungsi menghasilkan serat dan substansi interseluler aktif amorf (Janqueira *et al.*, 1998:106). Fibroblas merupakan sel induk yang berperan membentuk dan meletakkan serat-serat dalam matrik, terutama serat kolagen. Sel ini mensekresi molekul tropokolagen kecil yang bergabung dalam substansi dasar membentuk serat kolagen (Bajpai, 1989:26). Kolagen akan memberikan kekuatan dan integritas pada semua luka yang menyembuh dengan baik (Schwartz *et al.*, 2000:133).

Fibroblas merupakan sel yang menghasilkan serat-serat kolagen, retikulum, elastin, glikosaminoglikan, dan glikoprotein dari substansi interseluler amorf. Pada orang dewasa, fibroblas dalam jaringan mengalami perubahan. Mitosis hanya tampak jika organisme memerlukan fibroblas tambahan, yaitu jika jaringan ikat cedera (Janqueira *et al.*, 1998:106). Fibroblas lebih aktif mensintesis komponen matriks sebagai respon terhadap luka (Fawcett, 2002:132) dengan berproliferasi dan peningkatan fibrinogenesis. Oleh sebab itu, fibroblas menjadi agen utama dalam proses penyembuhan luka (Fawcett, 2002:149).

2.5.4 Peran Fibroblas pada Proses Penyembuhan

Pada saat jaringan mengalami jejas yang menyebabkan terbentuknya lesi atau perlukaan, maka proses penyembuhan luka tersebut merupakan fenomena yang kompleks dan melibatkan beberapa proses. Penyembuhan luka sebagai salah satu

prototip dari proses perbaikan jaringan merupakan proses yang dinamis, secara singkat meliputi proses inflamasi, diikuti oleh proses fibrosis atau fibroplasia, selanjutnya remodeling jaringan dan pembentukan jaringan parut (Kumar *et al.*, 2005:107).

Proses fibrosis atau fibroplasia dan pembentukan jaringan parut merupakan proses perbaikan yang melibatkan jaringan ikat yang memiliki empat komponen, yaitu : (a) pembentukan pembuluh darah baru, (b) migrasi dan proliferasi fibroblas, (c) deposisi ECM (*extracellular matrix*), dan (d) maturasi dan organisasi jaringan fibrous (remodeling). Dari keseluruhan proses yang telah disebutkan di atas, fibroblas memiliki peran penting pada proses fibrosis yang melibatkan dua dari keempat komponen di atas yaitu migrasi dan proliferasi fibroblas serta deposisi ECM oleh fibroblas (Kumar *et al.*, 2005:110).

Pada proses inflamasi terjadi perubahan vaskuler yang mempengaruhi besar, jumlah, dan permeabilitas pembuluh darah dan perubahan seluler yang menyebabkan kemotaksis ke arah jejas setelah proses inflamasi berkurang, dilanjutkan dengan proses fibrosis tahap awal yaitu migrasi dan proliferasi di daerah jejas. Migrasi dan proliferasi fibroblas terutama dipacu oleh *transforming growth factor- β* (TGF- β), yaitu faktor pertumbuhan yang dihasilkan oleh jaringan granulasi yang terbentuk selama proses inflamasi. Migrasi dan peningkatan proliferasi fibroblas di daerah jejas akan meningkatkan sintesis kolagen dan fibronektin, serta peningkatan deposisi matriks ekstraselular (Kumar *et al.*, 2005:110).

Pada tahap selanjutnya terjadi penurunan proliferasi sel endotel dan sel fibroblas, namun fibroblas menjadi lebih progresif dalam mensintesis kolagen dan fibronektin sehingga meningkatkan jumlah matriks ekstraselular yang berkurang selama inflamasi. Selain TGF- β , beberapa faktor pertumbuhan lain yang ikut mengatur proliferasi fibroblas juga membantu menstimulasi sintesis matriks ekstraselular. Pembentukan serabut kolagen pada daerah jejas merupakan hal yang penting untuk meningkatkan kekuatan penyembuhan luka. Sintesis kolagen oleh fibroblas dimulai relatif awal pada proses penyembuhan (hari ke 3-5) dan berlanjut

terus sampai beberapa minggu tergantung ukuran luka (Kumar *et al.*, 2005:110). Menurut Soderia & Saleh (1991:112), sintesis kolagen oleh fibroblas mencapai puncaknya pada hari ke-5 sampai ke-7. Proses sintesis ini banyak bergantung pada vaskularisasi dan perfusi di daerah lunak, dan mencapai hasil optimal dalam lingkungan yang sedikit asam.

Proses akhir dari penyembuhan luka adalah pembentukan jaringan parut, yaitu jaringan granulasi yang berbentuk spindel, kolagen, fragmen dari jaringan elastik dan berbagai komponen matriks ekstraselular (Kumar *et al.*, 2005:110). Jadi, pada saat jaringan mengalami perlukaan, maka fibroblas yang akan segera bermigrasi ke arah luka, berproliferasi dan memproduksi matriks kolagen dalam jumlah besar yang akan membantu mengisolasi dan memperbaiki jaringan yang rusak (Purnami, 2003:75).

BAB 3. METODE PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian

Jenis penelitian ini adalah penelitian eksperimental laboratoris, yaitu penelitian yang memberikan perlakuan pada subjek penelitian, efek perlakuan tersebut dipelajari dan penelitian dilaksanakan di laboratorium (Pratiknya, 2003:149).

3.2 Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian yang digunakan adalah *The Posttest Only Control Design Group*. Dalam rancangan penelitian ini diukur pengaruh perlakuan pada kelompok perlakuan dengan cara membandingkan kelompok tersebut dengan kelompok kontrol dan tidak dilakukan *pretest* (Notoatmodjo, 2002:167).

3.3 Waktu dan Tempat Penelitian

3.3.1 Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan pada bulan Februari - September 2008.

3.3.2 Tempat Penelitian

Tempat penelitian adalah sebagai berikut: (1) pemeliharaan hewan coba dilakukan di Bagian Biomedik Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember, (2) pembuatan ekstrak flavonoid propolis dilakukan di Laboratorium Biologi Farmasi Program Studi Farmasi Universitas Jember, (3) pemberian perlakuan pada hewan coba dilakukan di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember, dan (4) pemrosesan, perwarnaan dan pengamatan serta penghitungan sel dilakukan di Laboratorium Histologi Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.

3.4 Identifikasi Variabel Penelitian

3.4.1 Variabel Bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah flavonoid propolis lebah.

3.4.2 Variabel Tergantung

Variabel tergantung pada penelitian ini adalah proliferasi fibroblas pada hari ke-1, 3, 7, dan 15 pasca insisi flap gingiva.

3.4.3 Variabel Terkendali

Variabel terkontrol pada penelitian ini adalah sebagai berikut.

- a. Galur (*strain*), jenis kelamin, usia, dan berat badan tikus
- b. Proses ekstraksi flavonoid propolis lebah
- c. Pemberian dan dosis flavonoid propolis lebah
- d. Waktu perlakuan hewan coba
- e. Pembuatan insisi flap gingiva
- f. Pembuatan sediaan jaringan
- g. Pengecatan sediaan dengan *Hematoxylin Eosin*
- h. Pengamatan sel fibroblas pada sediaan jaringan

3.4.4 Variabel Tak Terkendali

Variabel tak terkontrol pada penelitian ini adalah sebagai berikut.

- a. Pengaruh psikologis (stress) pada subjek penelitian akibat prosedur sondase lambung
- b. Patogenitas bakteri di dalam rongga mulut subjek penelitian selama penelitian berlangsung
- c. Keakuratan keberadaan jahitan pasca pembuatan insisi flap gingiva sampai dengan hari pengorbanan subjek penelitian
- d. Keakuratan penghitungan sel fibroblas

3.5 Definisi Operasional Penelitian

3.5.1 Flavonoid Propolis lebah

Flavonoid propolis lebah adalah hasil ekstraksi propolis lebah yang diperoleh melalui teknik maserasi yang selanjutnya diambil senyawa flavonoidnya dan diberikan kepada subjek penelitian secara per oral dengan dosis tertentu.

3.5.2 Insisi Flap Gingiva

Flap merupakan suatu bagian mukosa yang secara bedah dipisahkan dari jaringan di bawahnya. Desain flap yang digunakan adalah flap mukoperiosteal bentuk *triangular flap* sepanjang ± 5 mm yaitu dengan cara melakukan insisi horizontal pada gingiva anterior di bawah dua gigi insisif sentralis rahang bawah dengan menggunakan *scapel* sampai jaringan periosteal dilanjutkan insisi vertikal/ serong ke arah posteror.

3.5.3 Fibroblas

Fibroblas adalah suatu sel yang bentuknya gelondong pipih, intinya lonjong, besar, dan pucat dengan kromatin halus dan anak inti yang jelas.

3.5.4 Proliferasi Fibroblas

Proliferasi fibroblas merupakan pertumbuhan jaringan melalui perbanyakan sel-sel fibroblas (bertambah banyaknya sel fibroblas). Proliferasi fibroblas diamati dengan parameter kuantitatif dengan menghitung jumlah sel fibroblas pada gambaran histologis jaringan.

3.6 Populasi dan Sampel Penelitian

3.6.1 Populasi Penelitian

Populasi sampel dan subjek penelitian adalah tikus putih galur Wistar (*Rattus norvegicus*).

3.6.2 Sampel Penelitian

a. Kriteria Sampel

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus dengan kriteria sebagai berikut.

1. Tikus putih (galur/ *strain* Wistar)
2. Jenis kelamin jantan
3. Tikus dengan berat badan 150-250 gram (± 200 gram)
4. Usia tikus $\pm 2-3$ bulan
5. Tikus dalam kondisi sehat (Rao *et al.*, 2007:150)

b. Besar Sampel

Besar sampel yang digunakan pada penelitian ini ditentukan dengan rumus sebagai berikut (Daniel, 2005:187).

$$n = \frac{Z^2 \sigma^2}{d^2}$$

Keterangan

n = Besar sampel minimal

Z^2 = Nilai pada tingkat kesalahan tertentu.

σ^2 = Standart deviasi penelitian sejenis

d = Kesalahan yang masih dapat ditoleransi

Berdasarkan perhitungan rumus diatas (Lampiran A), didapatkan jumlah sampel minimal sebanyak 4. Pada penelitian ini, jumlah sampel yang digunakan sebesar 10 % lebih banyak dari sampel minimal agar hasil penelitian lebih akurat dan dapat digunakan sebagai cadangan (Supriyadi, 2004:44). Jadi besar sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah 5.

c. Pengelompokan Sampel

Pengelompokan sampel dilakukan secara *simple random sampling*. Hal ini berarti tiap anggota memiliki peluang yang sama untuk masuk ke dalam kelompok penelitian (Tjokronegoro & Sudarsono, 2004:129). Pada penelitian ini

terdapat 2 kelompok sampel yaitu kelompok A (kontrol) dan kelompok B (perlakuan) yang terdiri 4 sub kelompok untuk tiap kelompok. Jumlah sampel pada masing-masing sub kelompok adalah 5 ekor tikus Wistar, sehingga besar sampel keseluruhan adalah 40 ekor tikus Wistar.

3.7 Alat dan Bahan Penelitian

3.7.1 Alat Penelitian (Lampiran B)

- a. Kandang tikus
- b. Tempat makan dan minum tikus
- c. Lap handuk
- d. Senter
- e. Timbangan
- f. Timbangan elektrik
- g. *Rotary Evaporator (Laborata 4000, Heidolph)*
- h. Labu *erlenmeyer (Pirex)*
- i. Gelas beaker (*Pirex*)
- j. Pengaduk spatula
- k. Corong *Buchner*
- l. Kertas saring
- m. Corong pemisah (*Duran*)
- n. Blender listrik
- o. Pot obat besar dan kecil
- p. Sarung tangan (*Latex*)
- q. Masker
- r. Gunting bedah
- s. Tabung anastesi
- t. Sonde lambung
- u. Pipet tetes
- v. *Scalpel*

- w. Ekskavator
- x. Sonde setengah lingkaran
- y. Pinset
- z. Petridish bersekat
- aa. Benang jahit bedah (silk)
- bb. Jarum jahit bedah
- cc. *Syringe* (alat suntik untuk anastesi)
- dd. *Stopwatch*
- ee. *Rotary mikrotom (Leica)*
- ff. *Blade (Tissue-Tek Accu-Edge 4687)*
- gg. Kuas
- hh. *Water bath (Mommert)*
- ii. *Oven (Mommert)*
- jj. *Desk glass*
- kk. Kaca Objek (*Sail Brand*)
- ll. Mikroskop binokuler (*Leica ATC 2000*)
- mm. Gratikule

3.7.2 Bahan Penelitian (Lampiran C)

- a. Tikus Wistar yang diperoleh dari Pusat Veterinaria Farma (Pusvetma) Surabaya
- b. Makanan (*Feedmill Malindo*) dan minuman tikus (*Aqua*)
- c. Propolis lebah mentah yang diperoleh dari Selecta, Malang-Jawa Timur
- d. Etanol 95%
- e. Toluena 500 ml
- f. *Aquadest* steril
- g. *Aquabidest*
- h. Air
- i. Ketalar/ ketamin
- j. Eter

- k. Larutan formalin buffer 10%
- l. *Xylol* (MERCK)
- m. Gliserin
- n. Parafin
- o. Larutan EDTA 10%
- p. Solusi *polyvinylpyrrolidone* 7,5%
- q. Larutan *Hematoxylin Eosin*
- r. Alkohol 70%, 80%, 95% dan 96% (*Brataco Chemika*)
- s. *Egg albumin*
- t. Entelan (MERCK)

3.8 Konversi Perhitungan Dosis

3.8.1 Penentuan *Dosis Flavonoid*

Pada penelitian ini hewan percobaan yang digunakan adalah tikus, oleh sebab itu perlu dilakukan konversi dosis untuk tikus tersebut. Perlakuan kepada hewan percobaan berupa dosis tunggal flavonoid. Penentuan dosis berdasarkan dosis pada manusia (berat badan 70 kg) yang dikonversikan kepada tikus (berat badan 200 g) menggunakan tabel konversi *Laurence-Bacharach* (Lampiran D) dengan faktor konversi 0,018 (Dubey *et al.*, 2005:10). Dosis rata-rata diet flavonoid untuk orang dewasa adalah sebanyak 1 g/hari (Moon *et al.*, 2006:118). Maka, konversi dosis pada tikus adalah sebagai berikut.

$$\begin{aligned} \text{Konversi dosis manusia (70 kg) ke tikus (200 g)} &= 0,018 \\ \text{Dosis flavonoid propolis per hari (manusia)} &= 1 \text{ g/hari} \\ \text{Dosis flavonoid yang diberikan pada tikus} &= 0,018 \times 1 \text{ g/hari} \\ &= 0,018 \text{ g/200 g BB/hari} \\ &= 0,09 \text{ g/kg BB/hari} \end{aligned}$$

Jadi dosis flavonoid propolis yang diberikan pada hewan coba adalah sebesar 0,09 g/kg BB/hari sesuai masing-masing berat badan tikus.

3.8.2 Penentuan *Dosis Ketamin*

Dosis anestesi ketamin = a + b (ml/g BB)

keterangan : a = Ketamin

$$= \frac{90}{1000} \times \text{BB tikus}$$

 b = *Aquabidest*

$$= 1/3 \times a \text{ (Wang et al., 1997:70).}$$

Dosis ketamin yang digunakan sesuai perhitungan adalah sebesar 24 ml/g BB (Lampiran E).

3.9 Prosedur Penelitian

3.9.1 Tahap Persiapan (Lampiran F)

a. Persiapan Ekstrak Propolis Lebah

Propolis mentah diperoleh dari peternakan lebah *Apis mellifera* di Selecta, Malang-Jawa Timur yang selanjutnya diolah menjadi ekstrak propolis dengan proses sebagai berikut. Proses pembuatan ekstrak propolis lebah dilakukan dengan teknik maserasi. Propolis kering dibersihkan dan diblender hingga halus selanjutnya ditimbang terlebih dahulu sebanyak 1 kg, kemudian dimasukkan ke dalam gelas beaker (Mawardi *et al.*, 2002; Sabir, 2005^b:136). Proses maserasi dilakukan dengan menambahkan 5 liter etanol 95% sebagai pelarut (Pietta *et al.*, 2002:1; Trusheva *et al.*, 2007:1). Campuran bahan disimpan selama 7 hari pada ruangan yang tidak terkena sinar matahari dengan dikocok kuat atau pengadukan dengan spatula pengaduk sebanyak 2 kali tiap hari (Susilo, 2007:73).

Tahap selanjutnya dilakukan penyaringan dengan corong *buchner* dan kertas saring untuk memisahkan filtrat dari ampas ke dalam labu *erlenmeyer* sehingga diperoleh filtrat ± 2,5 liter. Hasil filtrasi (penyaringan) yang didapat dievaporasi dengan *rotary evaporator* pada suhu 45° C dengan tekanan vakum (< 1 atm) sehingga diperoleh ekstrak propolis yang konsistensinya kental (± 100 g). Selanjutnya ekstrak propolis diuapkan selama 24 jam di dalam gelas beaker

sehingga kandungan etanolnya menguap (Mawardi *et al.*, 2002; Sabir, 2005^b:136). Selain itu untuk mengetahui kandungan etanol dalam ekstrak propolis benar-benar hilang, maka dilakukan metode uji bobot tetap terhadap ekstrak propolis.

b. Persiapan Ekstraksi Flavonoid Propolis

Ekstrak propolis selanjutnya dituang ke dalam labu *Erlenmeyer* dan ditambahkan 500 ml larutan toluena, lalu diaduk sehingga semua ekstrak larut. Larutan air : etanol = 2:1 (v/v) sebanyak 1,5 liter ditambahkan ke labu *erlenmeyer* yang berisi larutan ekstrak dalam toluena, kemudian diaduk hingga homogen dan didiamkan selama 24 jam (Sabir, 2005^b:136).

Setelah 24 jam, larutan dipindahkan ke dalam corong pemisah dan didiamkan selama 15 menit hingga terbentuk 2 lapisan. Selanjutnya melalui corong pemisah, larutan bagian bawah ($\pm 1,5$ liter) dipisahkan dan diuapkan selama 24 jam sehingga diperoleh ekstrak kental yang merupakan fraksi flavonoid polar (± 17 g) (Sabir, 2005^b:136).

c. Analisis Kimia Senyawa Flavonoid Propolis

Analisis kimia senyawa flavonoid menggunakan teknik kromatografi lapis tipis (KLT) dengan fase diam lempeng silika ge GF₂₅₄ dan fase gerak gerak larutan n-butanol : asam asetat : air = 3:1:1 (v/v) untuk mengetahui apakah ekstrak flavonoid yang diperoleh tidak mengandung unsur lain, selain senyawa flavonoid (Stahl, 1985:3; Sabir, 2005^b:137).

Ekstrak flavonoid yang telah dilarutkan dengan alkohol, diteteskan dengan pipet kapiler pada lempeng silika berukuran 10 cm x 2 cm dan dimasukkan ke bejana pengembang yang berisi fase gerak. Setelah daya kapiler dari ekstrak maksimal (bercak noda tidak bergerak lagi), lempeng dikeringkan, kemudian dilihat di bawah lampu ultraviolet sebelum dan setelah diuapi dengan amoniak (Sabir, 2005^b:137). Adanya flavonoid ditunjukkan dengan noda berwarna kuning

yang akan hilang perlahan ketika amoniaknya menguap dan meninggalkan noda pada tes uji warna (Tabel 3.1).

Tabel 3.1 Pencirian senyawa flavonoid pada kromatografi lapis tipis berdasarkan perubahan warna pada bercak noda hasil totolan pada lempeng silika setelah diuapi amonia

Golongan flavonoid	Perubahan pigmen
Antosianin	lembayung-biru
Flavon, flavonol	kuning
Flavanon	kuning muda
Kalkon, auron	lembayung-merah
Flavanonol	coklat-jingga

Sumber : Robinson, 1995:209-212

d. Persiapan Hewan Coba

Tikus Wistar jantan sebanyak 40 ekor dibagi menjadi 2 kelompok diadaptasikan pada lingkungan yang sama selama ± 1 minggu yang bertujuan untuk memperoleh keseragaman sebelum dilakukan penelitian dan untuk mengontrol hewan coba. Selanjutnya, tikus diberi makanan standar tikus (Lampiran G) dan minuman setiap hari secara *ad libitum* (sesukanya) dan agar sampelnya lebih terkontrol, maka tikus ditimbang sebelum dan sesudah proses adaptasi.

3.9.2 Tahap Pengelompokan Sampel

Hewan coba sebanyak 40 ekor tikus Wistar jantan dikelompokkan menjadi 2 kelompok secara acak, yaitu.

- a. Kelompok A, merupakan kelompok kontrol yang terdiri dari 20 ekor tikus Wistar jantan sehat yang diberi makanan standar tikus dan minum dengan pemberian 1 mL *aquadest* per oral setelah dilakukan insisi flap gingiva. Pemilihan *aquadest* sebagai bahan kontrol (*placebo*) pada penelitian ini disebabkan karena *aquadest*

merupakan bahan yang memiliki pH netral sehingga tidak menyebabkan iritasi pada jaringan. Kelompok kontrol dibagi menjadi empat sub kelompok sesuai periode dekapitasi, yaitu pada hari ke-1, 3, 7, dan 15.

- b. Kelompok B, merupakan kelompok perlakuan yang terdiri dari 20 ekor tikus Wistar jantan sehat yang diberi makanan standar tikus dan minum dengan pemberian flavonoid propolis per oral sebanyak $\pm 0,09$ g/kg BB/hari dalam 1 mL *aquadest* setelah dilakukan insisi flap gingiva. Kelompok perlakuan dibagi menjadi empat sub kelompok sesuai periode dekapitasi, yaitu pada hari ke-1, 3, 7, dan 15.

3.9.3 Tahap Pembuatan Insisi Flap

Hewan coba dianastesi dengan ketamin dan selanjutnya dilakukan insisi flap pada gingivanya pada hari ke-0. Pembuatan insisi flap gingiva pada penelitian ini dilakukan pada gingiva anterior di bawah insisif sentralis rahang bawah tikus yang bertujuan untuk mempermudah dilakukan tindakan pembuatan flap. Pembuatan insisi flap di daerah posterior atau molar akan sangat sulit dilakukan karena mulut hewan coba (tikus) sangat kecil. Prosedur insisi flap yang dilakukan pada penelitian ini adalah sebagai berikut.

- a. Desain flap yang digunakan adalah *triangular flap* (Gambar 3.1) dengan melakukan pembukaan mukosa periosteal melalui insisi pada jaringan lunak. Desain flap ini dilakukan dengan melakukan insisi flap horizontal dengan modifikasi insisi flap vertikal/ serong ke arah posterior.
- b. Insisi flap horizontal pada penelitian ini akan dilakukan pada gingiva anterior di bawah sepanjang dua gigi insisif sentralis (± 5 mm) rahang bawah tikus.
- c. Insisi flap vertikal/ serong dilakukan dengan ukuran panjang ± 5 mm dan kedalaman hingga mencapai mukoperiosteum (*full thickness flap*). Untuk menentukan panjangnya dengan menggunakan ekskavator yang telah diberi tanda sebelumnya.

- d. Dilakukan insisi flap gingival sesuai dengan tanda yang telah dibuat (Gambar 3.1) mencapai mukoperiosteum pada lipatan bukal anterior bawah kemudian dilanjutkan dengan diseksi jaringan untuk membuat *triangular flap*.



Gambar 3.1 Desain pembuatan insisi *triangular flap*

- e. Selanjutnya dilakukan penjahitan pada sudut insisi *triangular flap* untuk memfiksasi luka (Gambar 3.2).



Gambar 3.2 Letak pejahitan pada flap

3.9.4 Tahap Pemberian Flavonoid Propolis Lebah

Kelompok perlakuan (kelompok B) diberi flavonoid propolis lebah setiap hari mulai hari ke-0 sampai satu hari sebelum tikus didekapitasi (pukul 08.00-12.00).

Flavonoid propolis diberikan secara per oral dengan sonde lambung sebanyak satu kali sehari sesuai dosis yaitu sebesar $\pm 0,09$ g/kg BB/hari dalam 1 mL *aquadest*.

3.9.5 Tahap Preparasi Jaringan

Hewan coba pada kelompok kontrol dan perakuan didekapitasi pada hari ke-1, 3, 7, dan 15 secara inhalasi dengan eter (*eter chloride*), kemudian dilakukan pengambilan jaringan gingiva mandibula beserta gigi dan tulang alveolar. Selanjutnya dilakukan proses dekalsifikasi dengan EDTA 10% selama 10-20 hari pada suhu 4°C (Widodo, 2005:328). Jaringan yang telah didekalsifikasi kemudian difiksasi menggunakan larutan *buffer formalin* 10% (Supriyadi, 2004:45). Pembuatan sediaan histologis (preparat jaringan) dilakukan pada tahap selanjutnya.

3.9.6 Tahap Pembuatan Sediaan Preparat

Pemrosesan jaringan gingiva dengan *teknik rutin* untuk pembuatan sediaan histologis diperlukan tahap-tahap sebagai berikut.

- a. Melakukan pemotongan pada daerah yang dilakukan insisi flap gingiva berupa potongan sagital labio-lingual rahang bawah pada daerah insisif sentralis rahang bawah, mulai dari bagian ujung sampai dasar gingiva untuk dibuat sediaan histologis (Widodo, 2005:328).
- b. Melakukan proses fiksasi, dehidrasi, *clearing* dan impregnasi dengan mencelupkan jaringan ke dalam larutan seperti Tabel 3.2 dibawah ini sesuai dengan waktu yang ditentukan (Syafriadi *et al.*, 2006:5).

Tabel 3.2 Larutan fiksasi, dehidrasi, clearing dan impregnasi

Tabung	Larutan	Waktu	Proses
1	Formalin Buffer 10%	2 jam	Fiksasi
2	Alkohol 70%	15 menit	Dehidrasi
3	Alkohol 80%	1 jam	Dehidrasi
4	Alkohol 95%	2 jam	Dehidrasi

5	Alkohol 95%	1 jam	Dehidrasi
6	Alkohol 100%	1 jam	Dehidrasi
7	Alkohol 100%	1 jam	Dehidrasi
8	Alkohol 100%	1 jam	Dehidrasi
9	<i>Xylol</i>	1 jam	<i>Clearing</i>
10	<i>Xylol</i>	2 jam	<i>Clearing</i>
11	<i>Xylol</i>	2 jam	<i>Clearing</i>
12	Parafin cair (58 °-60 °C)	2 jam	Impregnasi
13	Parafin cair (58 °-60 °C)	2 jam	Impregnasi
14	Parafin cair (58 °-60 °C)	2 jam	Impregnasi

c. Pembuatan blok (*embedding*) dan pemotongan mikroskopis dengan mikrotom

- 1) Persiapan alat cetak terbuat dari logam berbentuk siku-siku disusun di atas permukaan kaca. Alat dan alas kaca diolesi gliserin untuk mempermudah pemisahan alat cetak dengan blok parafin yang sudah baku dan kaca.
- 2) Parafin cair dalam dua wadah, yaitu parafin untuk *embedding* dan parafin sebagai media penyesuaian temperatur yang akan ditanam.
- 3) Parafin cair pada tempat pertama dituangkan ke dalam alat cetak pertama hingga penuh ada permukaannya, lalu jaringan ditanam pada posisi yang sesuai dan bagian permukaan jaringan yang menempel pada kaca diusahakan rata.
- 4) Bila parafin sudah cukup keras, alat cetak dilepaskan dan blok parafin diberi label dan siap disayat.
- 5) Blok parafin ditempelkan pada alat pemegangnya yang berupa lempengan logam yang sudah dipanasi. Selanjutnya menentukan sisi blok yang akan dipotong, kemudian didinginkan sampai suhu kamar agar melekat erat.
- 6) Memasang pisau mikrotom pada pegangannya, membentuk sudut 5-10 derajat. Pisau harus tajam dan permukaannya harus benar-benar rata.

- 7) Menyiapkan *water bath* dengan mengatur suhu air di bawah titik leleh parafin (48°C).
- 8) Memasang blok yang sudah menempel pada pemegangnya pada *rotary mikrotom* dan melakukan pemotongan tipis dengan ketebalan 6 mikron.
- 9) Memindahkan hasil pemotongan berupa pita tipis dengan hati-hati ke dalam *water bath* agar sayatan jaringan dapat mengembang dengan baik. Selanjutnya menyeleksi dan memindahkan hasil sayatan di atas kaca objek yang telah diolesi dengan *egg albumin* dan diberi label sesuai label pada blok. Setiap preparat terdiri dari tiga potongan jaringan.
- 10) Sediaan jaringan dibiarkan kering dan dimasukkan ke dalam oven dengan suhu 58°-60°C selama 30 menit dan jaringan siap dilakukan tahap pengecatan.

3.9.7 Tahap Pengecatan *Hematoxylin Eosin*

Proses pengecatan sediaan secara histologis menggunakan *Hematoxylin Eosin* adalah seperti Tabel 3.3 di bawah ini (Syafriadi *et al.*, 2006:7).

Tabel 3.3 Proses pengecatan sediaan histologis

Proses	Larutan	Waktu
Deparafinisasi	<i>Xylol</i>	2-3 menit
	<i>Xylol</i>	2-3 menit
Hidrasi	Alkohol absolut	3 menit
	Alkohol absolut	3 menit
	Alkohol 95%	3 menit
	Alkohol 95%	3 menit
	Air mengalir	10 menit
Cat utama	<i>Mayer's Hematoxylin</i>	15 menit
	Air mengalir	20 menit
Cat pembanding	<i>Eosin</i>	15 detik-2 menit
Dehidrasi	Alkohol 95%	2-3 menit

	Alkohol 95%	2-3 menit
	Alkohol absolut	2-3 menit
	Alkohol absolut	2-3 menit
<i>Clearing</i>	<i>Xylol</i>	3 menit
	<i>Xylol</i>	3 menit
	<i>Xylol</i>	3 menit
<i>Mounting</i>	Entelan	5 menit

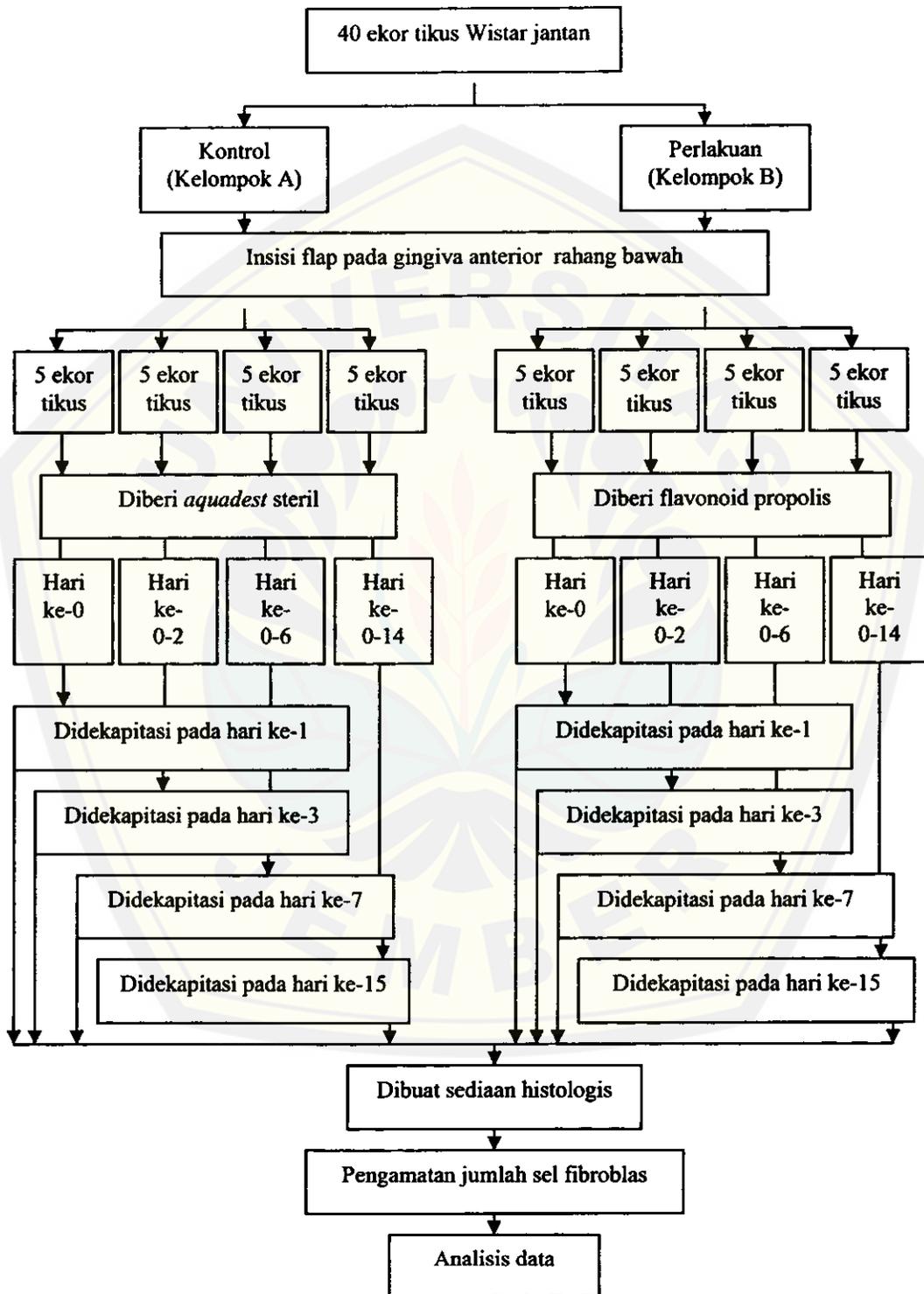
3.10 Pengamatan Histologis Proliferasi Fibroblas

Pengamatan secara histologis proliferasi fibroblas dilakukan dengan parameter kuantitatif untuk menghitung jumlah sel fibroblas. Penghitungan jumlah sel fibroblas menggunakan lensa obyektif yang sesuai pada mikroskop binokuler. Penghitungan di mikroskop dengan gratikule yang pembesarannya 400x. Selanjutnya dibaca sel fibroblas dengan cara menghitung sel fibroblas dalam kotak gratikule pada 3 lapang pandang, dan kemudian dilakukan tabulasi jumlah fibroblas (Subiyantoro, 2002:505).

3.11 Analisis Data

Dari hasil penelitian kemudian data ditabulasi dan diuji normalitasnya dengan test *Kormogorov-Smirnov* dan diuji homogenitasnya dengan uji *Levene*. Data selanjutnya dianalisis dengan uji *ANOVA* dua arah dengan tingkat kemaknaan 95% ($p < 0,05$) untuk mengetahui perbedaan jumlah sel fibroblas per hari tertentu (hari ke-1, 3, 7 dan 15) pada kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan. Apabila terdapat perbedaan yang bermakna, maka dilanjutkan dengan uji *LSD (Least Significant Difference)*.

3.12 Alur Penelitian





BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Hasil Penelitian

4.1.1 Data Penelitian

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan pada bulan Februari-September 2008 diperoleh hasil penelitian sebagai berikut (Tabel 4.1).

Tabel 4.1 Hasil perhitungan rata-rata jumlah sel fibroblas antara kelompok kontrol dan perlakuan pada hari ke-1, 3, 7, dan 15 (Lampiran H & I.1)

Hari Dekapitasi	Kontrol (K)			Perlakuan (P)		
	n	Rata-rata	Standar deviasi	n	Rata-rata	Standar deviasi
1	5	10,58	0,86	5	10,71	0,95
3	5	8,09	1,29	5	10,27	0,69
7	5	7,69	0,29	5	8,00	0,99
15	5	9,07	0,70	5	9,20	0,41

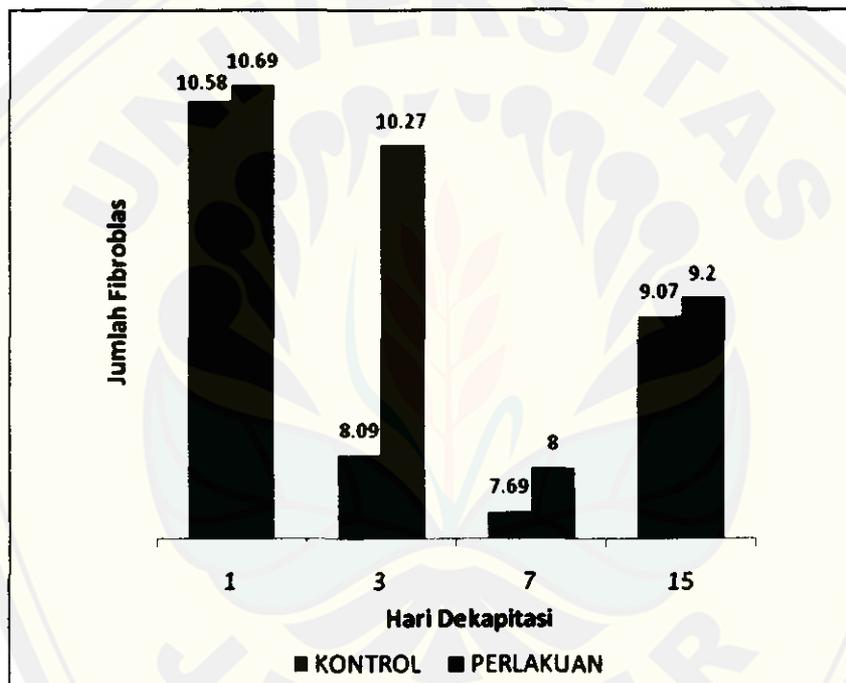
Keterangan : n = jumlah sampel

Berdasarkan Tabel 4.1 diatas, maka dapat diketahui sebagai berikut.

- 1) Rata-rata jumlah sel fibroblas pada kelompok perlakuan (10,71) lebih banyak daripada rata-rata jumlah sel fibroblas pada kelompok kontrol (10,58) pada hari ke-1.
- 2) Rata-rata jumlah sel fibroblas pada kelompok perlakuan (10,27) lebih banyak daripada rata-rata jumlah sel fibroblas pada kelompok kontrol (8,09) pada hari ke-3.
- 3) Rata-rata jumlah sel fibroblas pada kelompok perlakuan (8,00) lebih banyak daripada rata-rata jumlah sel fibroblas pada kelompok kontrol (7,69) pada hari ke-7.

- 4) Rata-rata jumlah sel fibroblas pada kelompok perlakuan (9,20) lebih banyak daripada rata-rata jumlah sel fibroblas pada kelompok kontrol (9,07) pada hari ke-15.

Hasil penelitian di atas menunjukkan bahwa rata-rata jumlah sel fibroblas pada kelompok perlakuan lebih banyak daripada kelompok kontrol pada hari ke-1, ke-3, ke-7 dan ke-15. Perbedaan rata-rata jumlah sel fibroblas yang paling nyata antara kelompok kontrol dengan perlakuan adalah pada hari ke-3 (Gambar 4.1).



Gambar 4.1 Histogram rata-rata jumlah sel fibroblas antara kelompok kontrol dan perlakuan pada hari ke-1, 3, 7, dan 15

Pada Gambar 4.1 jelas terlihat bahwa rata-rata jumlah sel fibroblas antara kelompok perlakuan lebih tinggi daripada kelompok kontrol. Pada hari ke-3 menunjukkan peningkatan yang nyata antara kontrol dengan perlakuan dibandingkan dengan pada hari ke-1, 7 dan 15 dengan kelompok perlakuan lebih banyak proliferasi sel fibroblasnya dibandingkan dengan kelompok kontrol.

4.1.2 Analisis Data

Analisis data hasil penelitian didahului dengan uji normalitas dan homogenitas data untuk mengetahui bahwa data terdistribusi normal dan homogen sebagai prasyarat dalam pengujian statistik parametrik. Uji normalitas dilakukan untuk mengetahui apakah distribusi data yang ada pada masing-masing variabel mengikuti kurva distribusi normal atau tidak. Uji normalitas data ini dilakukan dengan menggunakan *Kolmogorov-smirnov test* dengan $p > 0,05$ (Tabel 4.2).

Tabel 4.3 Hasil uji normalitas *Kolmogorov-smirnov test* jumlah sel fibroblas antara kelompok kontrol dan perlakuan (Lampiran I.2)

	Jumlah Fibroblas	
	Kontrol	Perlakuan
Sig. (<i>p</i>)	0,530*	0,945*

Keterangan : * = data normal ($p > 0,05$)

Berdasarkan analisis pada Tabel 4.2 dapat diketahui bahwa data pada kelompok kontrol maupun perlakuan menunjukkan nilai $p > 0,05$, maka data yang diperoleh pada penelitian ini memiliki *distribusi normal*.

Uji selanjutnya adalah uji homogenitas data menggunakan *Levene test* dengan $p > 0,05$ (Tabel 4.3). Hal ini dilakukan sebagai prasyarat dalam pengujian statistik parametrik.

Tabel 4.3 Hasil uji homogenitas *Levene test* jumlah sel fibroblas antara kelompok kontrol dan perlakuan (Lampiran I.3)

	Levene Statistik (F)	df1	df2	Sig. (<i>p</i>)
Hasil ukur	1,082	7	32	0,398*

Keterangan : * = data homogen ($p > 0,05$)

Berdasarkan analisis pada Tabel 4.3 dapat diketahui bahwa nilai signifikansinya sebesar 0,398 ($p > 0,05$), maka dapat dikatakan bahwa data tersebut adalah *homogen*.

Penggunaan uji parametrik dapat dilakukan setelah data tersebut memiliki distribusi normal dan homogen. Pada penelitian ini digunakan uji parametrik dengan

uji *ANOVA* dua arah (*Two Way ANOVA Test*). Uji *ANOVA* dua arah dilakukan untuk mengetahui apakah pengaruh pemberian flavanoid propolis lebah dan hari pengamatan pada sampel percobaan akan berpengaruh terhadap jumlah fibroblas atau untuk mengetahui kemaknaan perbedaan dari 8 kelompok. Tingkat kepercayaan yang digunakan adalah 95% ($p < 0,05$) (Tabel 4.4).

Tabel 4.4 Hasil uji *ANOVA* dua arah antara pengaruh pemberian per oral flavanoid propolis lebah dan hari dekapitasi terhadap jumlah sel fibroblas (Lampiran I.4)

Keragaman	Jumlah kuadrat	df	Kuadrat tengah	F	Sig. (<i>p</i>)
Kelompok	4,900	1	4,900	7,292	0,011*
Hari	39,320	3	13,107	19,506	0,000*
Kelompok * Hari	8,101	3	2,442	3,634	0,023*

Keterangan : * = berbeda bermakna ($p < 0,05$)

Berdasarkan uji *ANOVA* dua arah (Tabel 4.4), maka dapat diketahui bahwa.

- 1) Parameter “kelompok (kontrol-perlakuan)” memiliki nilai signifikansi sebesar 0,011 ($p < 0,05$) yang dapat disimpulkan bahwa terdapat *perbedaan yang bermakna* dari jumlah fibroblas antar kelompok.
- 2) Parameter “hari dekapitasi” menunjukkan nilai signifikansi sebesar 0,000 ($p < 0,05$) yang dapat disimpulkan bahwa terdapat *perbedaan yang bermakna* dari jumlah fibroblas pada hari pengamatan yang dilakukan.
- 3) Parameter “kelompok*hari” atau kelompok yang diinteraksikan dengan parameter hari memiliki nilai signifikansi sebesar 0,023 ($p < 0,05$) yang dapat disimpulkan bahwa terdapat *perbedaan yang bermakna* dari jumlah fibroblas antara kelompok kontrol dan perlakuan dengan hari dekapitasi.

Untuk mengetahui kelompok mana pada hari dekapitasi tertentu yang memiliki perbedaan bermakna, maka dilanjutkan uji *Post Hoc LSD* dengan tingkat kemaknaan 95% ($p < 0,05$). Hasil uji beda *LSD* dapat dilihat pada Tabel 4.5 dan Tabel 4.6 sebagai berikut.

Tabel 4.5 Hasil uji beda LSD pada parameter hari dekapitasi (Lampiran I.5.a)

Kombinasi	Hari ke-1	Hari ke-3	Hari ke-7	Hari ke-15
Hari ke-1	-	0,000*	0,000*	0,000*
Hari ke-3	0,000*	-	0,000*	0,948
Hari ke-7	0,000*	0,000*	-	0,000*
Hari ke-15	0,000*	0,948	0,000*	-

Keterangan : * = berbeda bermakna ($p < 0,05$)

Tabel 4.6 Hasil uji beda LSD pada parameter (kelompok*hari) (Lampiran I.5.b)

Kombinasi	K-1	K-3	K-7	K-15	P-1	P-3	P-7	P-15
K-1	-	0,000*	0,000*	0,006*	0,801	0,552	0,000*	0,015*
K-3	0,001*	-	0,444	0,069	0,000*	0,000*	0,863	0,033*
K-7	0,000*	0,444	-	0,012*	0,000*	0,000*	0,552	0,005*
K-15	0,006*	0,069	0,003*	-	0,012*	0,027*	0,048*	0,734
P-1	0,801	0,000*	0,000*	0,003*	-	0,398	0,000*	0,008*
P-3	0,552	0,000*	0,000*	0,027*	0,398	-	0,000*	0,057
P-7	0,000*	0,863	0,552	0,048	0,000*	0,000*	-	0,022*
P-15	0,015*	0,033*	0,005*	0,734	0,008*	0,057*	0,022*	-

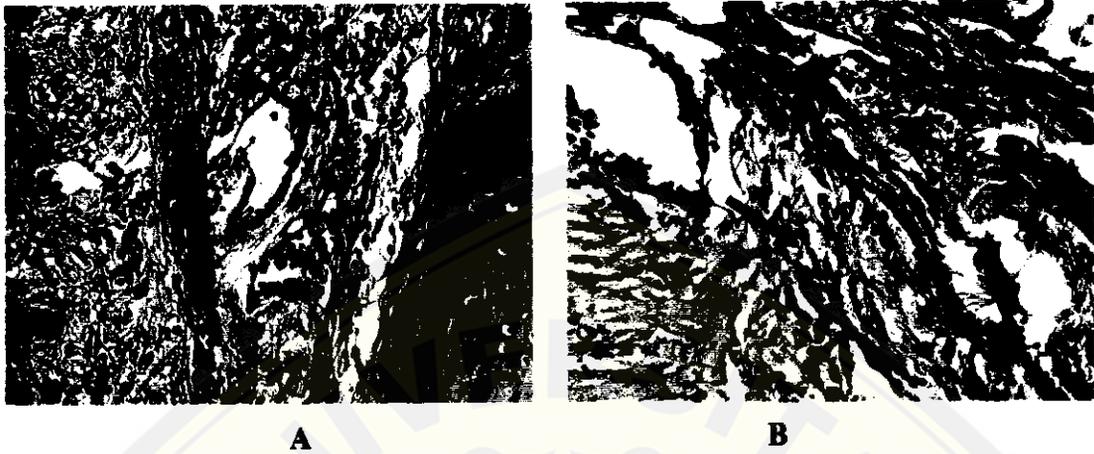
Keterangan : * = berbeda bermakna ($p < 0,05$)
 K-x = kelompok kontrol pada hari dekapitasi ke-x
 P-x = kelompok perlakuan pada hari dekapitasi ke-x

Berdasarkan hasil uji beda LSD (Tabel 4.5), dapat diketahui bahwa semua kombinasi hari dekapitasi memiliki *perbedaan yang bermakna* kecuali pada kombinasi hari ke-3 dengan hari ke-15 *tidak terdapat perbedaan yang bermakna*. Selain itu, sebagian besar menunjukkan perbedaan yang bermakna (tanda *) dari jumlah sel fibroblas pada kombinasi kelompok dengan hari dekapitasi (Tabel 4.6).

4.1.3 Foto Mikroskopik Sel Fibroblas



Gambar 4.2 Foto daerah pengamatan di bawah mikroskop. (A) Jaringan keras gigi. (B) daerah insisi flap gingiva. (C) daerah pengamatan proliferasi fibroblas. Pengecatan HE dengan pembesaran 100X.



Gambar 4.3 Foto mikroskopik sel fibroblas (*anak panah*). (A) kelompok kontrol dan (B) kelompok perlakuan pada hari ke-1 dengan pengecatan HE (pembesaran 400X).



Gambar 4.4 Foto mikroskopik sel fibroblas (*anak panah*). (A) kelompok kontrol dan (B) kelompok perlakuan pada hari ke-3 dengan pengecatan HE (pembesaran 400X).



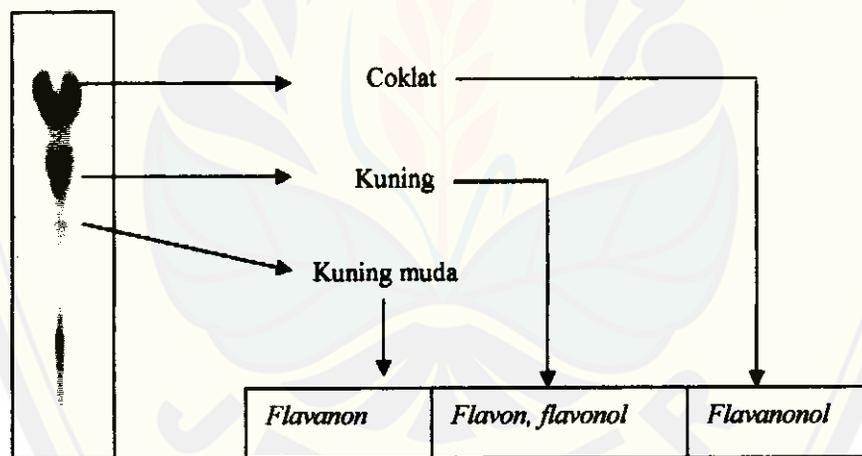
Gambar 4.5 Foto mikroskopik sel fibroblas (*anak panah*). (A) kelompok kontrol dan (B) kelompok perlakuan pada hari ke-7 dengan dengan pengecatan HE (pembesaran 400X).



Gambar 4.6 Foto mikroskopik sel fibroblas (*anak panah*). (A) kelompok kontrol dan (B) kelompok perlakuan pada hari ke-15 dengan dengan pengecatan HE (pembesaran 400X).

4.1.4 Analisis Kimia Ekstrak Propolis Lebah

Hasil proses ekstraksi senyawa flavonoid dari propolis lebah yang berasal dari Malang, Jawa Timur diperoleh fraksi flavonoid polar. Hasil analisis kromatografi lapis tipis (KLT) dengan fase diam lempeng silika ge GF₂₅₄ dan fase gerak gerak larutan n-butanol : asam asetat : air = 3:1:1 (v/v) memberikan hasil positif kandungan bahan yang diekstrak merupakan senyawa flavonoid. Pengamatan dilakukan pada bercak noda yang timbul dan berfluoresensi di bawah sinar UV_{max} λ 366 nm. Pada uji warna dibawah sinar ultraviolet, bercak noda warna kuning pada lempeng silika setelah diuapi dengan uap amonia memberikan warna kuning dan coklat-jingga yang menandakan golongan flavonoidnya adalah *flavon*, *flavonol*, *flavanon* dan *flavanonol* (Tabel 3.1). Hasil identifikasi bercak noda di bawah sinar ultra violet adalah sebagai berikut.



Gambar 4.7 Hasil uji warna kromatografi lapis tipis fraksi flavonoid polar dari propolis lebah

4.2 Pembahasan

Penyembuhan luka pada seluruh jaringan setelah terjadi luka pada dasarnya mempunyai pola yang sama, tetapi memiliki beragam modifikasi penyembuhan, tergantung dari faktor-faktor intrinsik dan ekstrinsik yang meliputi beberapa tahap (Kabal-Dzik *et al.*, 2004:111). Penyembuhan luka pasca insisi flap gingiva

berlangsung melalui beberapa tahapan biologis yang kompleks, penyembuhan ini dapat diamati secara histologis dengan memantau jumlah dan aktivitas sel-sel radang, pembuluh darah baru, fibroblas, dan serabut kolagen. Fibroblas merupakan salah satu sel utama yang terlibat pada proses penyembuhan luka. Proliferasi atau pembentukan sel fibroblas pada tahap awal penyembuhan luka mengindikasikan adanya proses penyembuhan yang berlangsung secara cepat.

Fibroblas merupakan sel yang aktif ketika terjadi respon terhadap luka dengan berproliferasi dan peningkatan fibrinogenesis sehingga menjadi agen utama dalam proses penyembuhan luka. Pembentukan fibroblas merupakan suatu tanda bahwa luka telah memasuki fase proliferasi. Fibroblas mulai terbentuk pada hari ke-3 dan jumlahnya mencapai maksimal pada hari ke-7 (Fawcett, 2002:130) sampai hari ke-14, selanjutnya jumlahnya akan menurun. Penurunan jumlah fibroblas terjadi setelah pembentukan kolagen pada proses penyembuhan luka sudah cukup.

Penggunaan bahan yang memiliki efek anti-inflamasi, antibakteri dan kemampuan regenerasi sel sekaligus dalam satu formulasi sangat efektif dalam mempercepat proses penyembuhan luka. Hal ini disebabkan karena sifat anti-inflamasi dapat meringankan proses fagositosis dan semakin cepat proses inflamasi ini hilang, semakin cepat pula penyembuhan luka terjadi (Bahar, 2001:536). Selain itu, sifat antibakterial suatu bahan dapat menekan pertumbuhan bakteri patogen yang dapat meminimalisir infeksi sekunder yang menghambat penyembuhan luka (Robbins & Kumar, 1995:64).

Bahan yang digunakan untuk mempercepat penyembuhan luka pada penelitian ini berupa flavonoid propolis lebah dari Malang-Jawa Timur dalam bentuk ekstrak cair melalui proses maserasi menggunakan larutan etanol 95%. Propolis lebah memiliki peran kompleks sebagai bahan anti-inflamasi dan antibakteri yang dapat digunakan sebagai fasilitator dengan memberi peluang bagi luka untuk sembuh secara normal tanpa adanya gangguan invasi bakteri patogen yang memperlama proses penyembuhan luka. Apalagi pada penelitian ini, patogenitas bakteri di dalam rongga mulut hewan coba tidak dikendalikan, tidak dicegah dan dibiarkan secara alami

berada di dalam rongga mulut yang telah dilakukan perlakuan dengan insisi flap gingiva.

Pada penelitian ini pemberian flavonoid propolis lebah dilakukan secara per oral, sehingga aktifitas bahan dapat menjadi lebih panjang karena absorpsi yang lambat. Penggunaan secara per oral dapat memberikan efek sistemik yaitu obat dapat beredar melalui pembuluh darah ke seluruh tubuh setelah terjadi absorpsi obat (Anief, 2000:43-44). Propolis lebah yang diaplikasikan secara per oral pada hewan coba dalam bentuk ekstrak cair sebelumnya dianalisis dengan menggunakan teknik kromatografi lapis tipis (KLT) untuk mengetahui tingkat kemurnian atau purifikasi dari ekstrak.

Hasil penelitian yang telah dilakukan menunjukkan bahwa pemberian flavonoid propolis lebah secara per oral dengan dosis 0,09 g/kg BB/hari dalam 1 mL *aquadest* berpengaruh terhadap proliferasi atau pembentukan sel fibroblas pasca insisi flap gingiva tikus Wistar jantan. Secara statistik, melalui uji *ANOVA* dua arah terbukti bahwa terdapat perbedaan yang bermakna antara kelompok perlakuan dengan kelompok kontrol ($p < 0,05$). Secara deskriptif, jumlah sel fibroblas pada kelompok perlakuan terdapat pertambahan jumlah sel fibroblas yang lebih banyak dibandingkan dengan kelompok kontrol. Hal ini dapat dilihat dari kecepatan proliferasi fibroblas yang menunjukkan pembentukan fibroblas dengan pemberian flavonoid propolis lebah jumlah rata-ratanya lebih besar dibandingkan dengan kontrol.

Pada uji *Post Hoc LSD* dengan parameter hari pengamatan menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang bermakna, kecuali apabila hari ke-3 dikombinasikan dengan hari ke-15 maka tidak terdapat perbedaan yang bermakna. Pada uji *Post Hoc LSD* menunjukkan bahwa hampir semua berbeda bermakna ($p < 0,05$) dari jumlah fibroblas untuk kombinasi kelompok dengan hari pengamatan.

Pada hasil penelitian ini, tampak jumlah sel fibroblas yang lebih banyak pada kelompok perlakuan dibandingkan dengan kelompok kontrol. Hal ini membuktikan bahwa flavonoid propolis lebah dapat mempercepat proses penyembuhan luka dengan merangsang sel fibroblas untuk berproliferasi. Mekanisme flavonoid propolis lebah

yang diberikan secara per oral pasca insisi flap gingiva diduga melalui peran perantara makrofag pada fase inflamasi yang berfungsi dalam merangsang pembentukan fibroblas. Makrofag berpengaruh pada migrasi fibroblas ke daerah luka dengan memfagosit debris, fibrin dan benda asing serta menggabungkan kerja faktor *transforming growth factor- β* (TGF- β), *platelet derived growth factor* (PDGF) dan *fibroblast growth factor* (FGF) yang akan memicu proliferasi dan migrasi fibroblas (Kumar *et al.*, 2005:110).

Proliferasi Fibroblas Pasca Insisi Flap Gingiva pada Hari ke-1

Pada hari ke-1, tampak bahwa rata-rata jumlah sel fibroblas pada kelompok perlakuan lebih banyak dibandingkan dengan kelompok kontrol (Gambar 4.1). Jumlah sel fibroblas pada hari ke-1 tampak lebih banyak apabila dibandingkan dengan hari-hari selanjutnya. Hal ini disebabkan pada saat jaringan mengalami perlukaan, maka fibroblas yang akan segera bermigrasi ke arah luka, berproliferasi dan memproduksi matriks kolagen dalam jumlah besar yang akan membantu mengisolasi dan memperbaiki jaringan yang rusak.

Pada kelompok kontrol, respon inflamasi pada daerah luka dengan adanya peningkatan makrofag akan melakukan fagositosis dan pelepasan sitokin berupa IL-1 (*interleukin 1*) dan TNF (*tumor necrosis factor*) (Kumar *et al.*, 2005:71). Produk sitokin ini selanjutnya akan merangsang pembelahan sel fibroblas secara normal (Spector, 1993:126-127).

Pada kelompok perlakuan, rata-rata jumlah sel fibroblas lebih banyak dibandingkan dengan kelompok kontrol. Selain dari hasil proliferasi fibroblas secara normal, peningkatan jumlah sel fibroblas disebabkan karena aktivitas flavonoid dari ekstrak propolis lebah. Flavonoid propolis lebah dapat bersifat anti-inflamasi dengan menghambat sintesis eikosanoid. Penghambatan ini akan menyebabkan penurunan kandungan asam arakidonat pada jaringan membran fosfolipid sel yang mengakibatkan terhambatnya pelepasan sejumlah mediator inflamasi seperti

prostaglandin, leukotrin dan tromboksan (Sabir, 2005^a:81), sehingga gangguan pada jaringan akan berkurang.

Pemberian flavonoid propolis lebah akan menekan respon inflamasi berkepanjangan dan menstimulasi aktivitas fibroblas melalui perantara makrofag (Mawardi *et al.*, 2002:181). Selain itu, penurunan tekanan hidrostatik cairan interstitial akibat aktivitas anti-inflamasi juga dapat memperbaiki sirkulasi jaringan dan mempercepat proses regenerasi jaringan (Ernawati, 2001:475).

Proliferasi Fibroblas Pasca Insisi Flap Gingiva pada Hari ke-3

Pada hari ke-3, tampak bahwa rata-rata jumlah sel fibroblas pada kelompok perlakuan lebih banyak dibandingkan dengan kelompok kontrol (Gambar 4.1). Jumlah sel fibroblas mengalami penurunan dibandingkan dengan kelompok pengamatan pada hari ke-1. Namun, terdapat perbedaan rata-rata jumlah sel fibroblas yang sangat mencolok antara kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan.

Pada kelompok kontrol, jumlah sel fibroblas lebih sedikit dibandingkan dengan kelompok kontrol hari ke-1. Hal ini dimungkinkan karena pada tahap ini terjadi penurunan proliferasi sel fibroblas guna pembentukan serabut kolagen. Pada kelompok perlakuan, rata-rata jumlah sel fibroblas lebih banyak dibandingkan dengan kelompok kontrol. Selain dari hasil proliferasi fibroblas secara normal, peningkatan jumlah sel fibroblas disebabkan adanya kemampuan flavonoid propolis lebah dalam meningkatkan mitogenesis dan interaksi sel serta adhesi molekul (Ernawati, 2001:475), khususnya sel fibroblas.

Berkaitan dengan regenerasi jaringan, flavonoid pada propolis mampu mengatur fungsi sel dengan cara menghambat maupun merangsang protein fosforilase. Flavonoid propolis lebah akan merangsang produksi TGF- β (*Transforming Growth Factor- β*) yang dapat meningkatkan migrasi dan proliferasi fibroblas di daerah jejas luka (Sabir *et al.*, 2005:136), sehingga dapat mempercepat proses penyembuhan luka. Propolis juga dapat meningkatkan regenerasi sel karena kandungan *galangin* berfungsi meningkatkan kerja sel limfosit T. Sel limfosit T ini

berfungsi menstimulasi IL-1 untuk meregulasi pembentukan epitel dan fibroblas (Hernawati, 2007:13). Selain itu, adanya aktifitas antibakterial dari flavonoid propolis lebah juga berperan dalam proses penyembuhan luka.

Berdasarkan identifikasi kandungan melalui teknik KLT, propolis lebah yang digunakan dalam penelitian ini mengandung senyawa flavonoid berupa *flavon*, *flavonol*, *flavanon* dan *flavanonol*. Menurut Fernandez Junior *et al.* (2005:563), kandungan flavonoid yang sangat penting pada mekanisme antibakterial adalah *galangin* dan *pinocembrin*. Galangin merupakan salah satu golongan dari *flavonol* yang telah teridentifikasi dalam propolis yang digunakan dalam penelitian ini.

Peran aktifitas antibakterial dari flavonoid propolis lebah pada proses penyembuhan luka sangat penting. Takasi *et al.*, (1994) menyebutkan beberapa mekanisme aksi propolis dalam menghambat pertumbuhan bakteri antara lain: (1) menghambat pertumbuhan bakteri dengan mencegah pembelahan sel; (2) merusak dinding bakteri, membran sitoplasma dan sitoplasmanya; (3) menyebabkan bakteriolisis parsial; dan (4) penghambatan sintesis protein. Selain itu, mekanisme dalam mencegah mobilitas sel dan mengubah permeabilitas ion pada membran dalam bakteri juga dapat membunuh dan menghambat pertumbuhan bakteri (Mirzoeva *et al.*, 1997). Setelah bakteri patogen dibunuh dan pertumbuhannya ditekan, maka pada akhirnya dapat meminimalisir infeksi sekunder yang menghambat penyembuhan luka, sehingga proses penyembuhan luka dapat berjalan lancar tanpa gangguan.

Proliferasi Fibroblas Pasca Insisi Flap Gingiva pada Hari ke-7 dan Hari Ke-15

Pada hari ke-7 dan ke-15, jumlah sel fibroblas yang tampak melalui pemeriksaan histologis pada kelompok perlakuan juga terlihat gambaran sel-sel fibroblas yang lebih banyak dan padat dibandingkan dengan kelompok kontrol (Gambar 4.6). Namun pada hari ke-7 dan ke-15, rata-rata jumlah sel fibroblas antara kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan berbeda tipis. Hal dimungkinkan karena lamanya kontak flavonoid mempengaruhi penurunan aktivitas antibakterialnya

karena terjadi penurunan metabolisme flavonoid sehingga efektivitasnya menurun (Havsteen, 2002 *dalam* Sabir, 2005^b:140).

Pada kelompok kontrol hari ke-7, proses proliferasi mulai menurun dibandingkan pada hari ke-3. jumlah sel fibroblas mengalami penurunan dibandingkan dengan jumlah sel fibroblas hari ke-3. Hal ini diduga karena proses sintesis kolagen oleh fibroblas terjadi relatif awal pada minggu pertama. Apalagi penelitian ini menggunakan hewan coba tikus Wistar yang waktu penyembuhannya lebih cepat daripada manusia (Saptoyono, 1996:17), sehingga jumlah sel fibroblas normal menurun. Namun, pada kelompok kontrol hari ke-15 jumlah sel fibroblas mengalami peningkatan lagi dibandingkan dengan hari ke-7. Hasil penelitian pada hari ke-15 ini sesuai dengan penelitian Ismardianita *et al.* (2003) pada tikus Wistar, yang menyatakan bahwa peningkatan proliferasi fibroblas terjadi setelah hari kelima belas untuk pembentukan kolagen.

Pada kelompok perlakuan, sel fibroblas merupakan hasil dari proses proliferasi sel fibroblas secara normal dan jumlahnya hampir sama dengan kelompok kontrol dikarenakan pengaruh efektivitas flavonoid yang menurun. Efektivitas flavonoid dalam propolis lebah yang menurun menyebabkan kemampuannya juga berkurang, termasuk kemampuan untuk meningkatkan proliferasi fibroblas. Berdasarkan hasil penelitian ini, peneliti menyatakan bahwa pemberian flavonoid propolis lebah tidak efektif lagi pada hari pengamatan ke-7 dan ke-15 dan penggunaan flavonoid propolis lebah efektif digunakan hingga pada hari ke-3 setelah terjadi perlakuan.

Kekurangan dalam penelitian ini adalah dosis flavonoid propolis lebah yang diberikan secara per oral pada hewan coba terlalu kecil yaitu 0,09 g/kg BB/hari dalam 1 mL aquadest steril sehingga efek farmakologisnya kurang optimal. Hal ini dapat terlihat pada hasil rata-rata jumlah fibroblas antara kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan sangat sedikit perbedaannya. Hal ini tetapi tidak terjadi pada pengamatan hari ketiga yang memberikan hasil perbedaan yang sangat nyata, karena

proses migrasi dan proliferasi fibroblas pada daerah jejas terlokalisir pada awal hari ketiga.

Penggunaan aplikasi dalam bentuk cairan secara per oral, kemungkinan akan mudah terbuang oleh aliran darah dan air liur. Hal ini berbeda apabila aplikasi flavonoid propolis lebah diberikan secara lokal dalam bentuk tepung, karena konsistensi bentuk ini setengah padat sehingga mudah diserap oleh darah (Nurrohman *et al.*, 2002: 101). Pemberian obat secara per oral (sistemik) perjalanannya sangat panjang untuk mencapai sasaran yang dimulai dari absorsi di jaringan intestinal, selanjutnya diuraikan di hepar yang kemudian didistribusikan melalui sistem vaskular dan akhirnya mencapai jaringan periodontal dalam konsentrasi yang sangat diencerkan. Hal ini menyebabkan konsentrasinya rendah di jaringan, sehingga disarankan untuk memberikan dosis yang lebih besar lagi agar hasilnya optimal.

BAB 5. SIMPULAN DAN SARAN

5.1 Simpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan, maka dapat ditarik kesimpulan sebagai berikut.

1. Pemberian flavonoid propolis lebah berpengaruh terhadap proliferasi fibroblas pasca insisi flap gingiva pada tikus galur Wistar jantan.
2. Proliferasi fibroblas pasca insisi flap gingiva secara histologis pada kelompok perlakuan lebih tinggi daripada kelompok kontrol pada hari ke-1, 3, 7 dan 15.

5.2 Saran

1. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai kandungan flavonoid propolis lebah dengan menggunakan berbagai dosis untuk mencari dosis yang paling efektif dan memiliki efek farmakologis yang optimal dalam proses penyembuhan luka.
2. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai pengaruh aplikasi lokal flavonoid propolis lebah dalam bentuk *surgical pack* untuk proses penyembuhan luka pasca insisi flap gingiva.
3. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai pengaruh pemberian flavonoid propolis lebah dibandingkan dengan obat sintesis di pasaran untuk proses penyembuhan luka pasca insisi flap gingiva.

DAFTAR BACAAN

- Almas, K., Dahlan, A., and Mahmoud, A. 2001. Propolis as A Natural Remedy: An Up Date. *Saudia Dental Journal*. 13 (1): 45-49.
- Bahar, M.L. 2001. Pengaruh Hidroksiapatit terhadap Penyembuhan Luka Pencabutan Gigi. *Maj Ked Gigi (Dental J)*. 34(3a): 541-544.
- Anief, M. 2000. Farmasetika. Yogyakarta: Gadjah Mada University Press.
- Bajpai, R.N. 1989. *Human Histology: with Elementary Genetics*. Disadur Jan Tambajong. *Histologi Dasar*. Jakarta: Binarupa Aksara.
- Bankova, V.S., de Castro, S.L., and Marcucci, M.C. 2000. Propolis: Recent Advances in Chemistry and Plant Origin. *Apidologie*. 3: 3-15.
- Caranza, F.A. 2002. *Clinical Periodontology*. 9th Edition. Philadelphia: W.B. Saunders Company.
- Cormack, D.H. 1994. *Ham's Histology*. Disadur Jan Tambajong. *Ham Histologi*. Jilid I. Edisi 9. Jakarta: Binarupa Akasara.
- Daniel, W.W. 2005. *Biostatistic a Foundation for Analysis in the Health Sciences*. 8th Edition. Georgia: Wiley.
- de Almeida, E.C. & Menezes, H. 2002. Anti-Inflammatory Activity of Propolis Extract: A Review. *J Venom Anim Toxins*. 8 (2).
- Dharmayanti, N.L.P.I., Sulistyowati, E., Tejolaksono, M.N., dan Prasetya, R. 2000. Efektifitas Pemberian Propolis Lebah dan *Royall Jelly* pada Abses yang Disebabkan *Staphylococcus aureus*. *Berita Biologi Jurnal Ilmiah Nasional*. 5 (1): 41-48.
- Dubey, A.K., Devi, A., Kutty, G., and Shankar, R.P. 2005. Hypolipidemic Activity of Ginkgo Biloba Extract, EGb 761 m Hypercholesterolemic Wistar Rats. *Iranian Journal of Pharmacology & Therapeutics*. 4 (1): 9-12.

- Ernawati, D.S. 2001. Madu Sebagai Terapi Alternatif Stomatitis Aftosa Rekuren (SAR). *Maj Ked Gigi (Dent J)*. 34 (3a): 473-476.
- Eroschenko, V.P. 2003. *Di Fiore Atlas of Histology with Functional Correlations*. Disadur Jan Tambanyong. *Atlas Histologi di Fiore dengan Korelasi Fungsional*. Edisi 9. Jakarta: EGC.
- Farre, R., Frasset, I., and Sanchez, A. 2004. El Propolis y La Salud (Propolis and Human Health). *Ars Pharmaceutica*. 45 (1): 21-43.
- Fawcett, D.W. 2002. *Textbook of Histology*. 12nd Edition. Disadur Jan Tambajong. *Buku Ajar Histologi*. Edisi 12. Jakarta: EGC.
- Fedi, P.F., Vernino, A.R., and Gray, J.L. 2004. *The Periodontic Syllabus*. 4th Edition. Disadur Amaliya. *Silabus Periodonti*. Edisi 4. Jakarta: EGC.
- Fernandez Junior, A., Balestrin, E.C., Betoni, J.E.C., Orsi, R.O., Cunha, M.L.R.S., and Montelli, A.C. 2006. Propolis: Anti-*Staphylococcus aureus* Activity and Synergism With Antimicrobial Drugs. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 100(5): 563-66.
- Fu, Y. & Wen, C. 2005. Analysis of Flavonoids in Propolis by Capillary Eletrophoresis. *J. Food Drug Analysis*. 13(1): 45-50.
- Galvao, J., Abreu, J.A., Cruz, T. Machado, G.A.S., Niraldo, P., Dausch, A., Moraes, C.S., Fort, P., and Park, Y.K. 2007. Biological Therapy Using Propolis as Nutritional Supplement in Cancer Treatment. *Int. J. Cancer Res*. 3 (1): 43-53.
- Gartner, L.I. & Hiatt, J.L. 2001. *Color of Textbook of Histology*. 2th Edition. Philadelphia: W.B Saunders Company.
- Hernawati, S. 2007. Terapi Topikal dengan Menggunakan Propolis terhadap *Recurrent Aphthous Stomatitis (RAS)*. *Stomatognatic (JKG UNEJ)*. 4(1): 10-14.
- Howe, G.L. 1995. *The Extraction of Teeth*. Disadur Sianita Kurniawan. *Pencabutan Gigi Geligi*. Edisi 2. Jakarta: EGC.
- Isgianto, W.A. 2005. "Pengaruh Vitamin C Terhadap Jumlah Neutrofil PMN pada Proses Penyembuhan Luka pada Gingiva Tikus (*Rattus novvergicus*)". Tidak Dipublikasikan. *Skripsi*. Jember: Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.

- Ismardianita, E., Soebijanto, dan Sutrisno. 2003. Pengaruh Kuretase terhadap Penyembuhan Luka Pasca Pencabutan Gigi Kajian Histologi pada Tikus Putih Galur Wistar. *Dentika Dental Journal*. 8 (2): 75-80.
- Junqueira, L.C., Carneiro, J., and Kelley, R.O. 1998. *Basic Histology*. Disadur Jan Tambajong. *Histologi Dasar*. Edisi 10. Jakarta: EGC.
- Junqueira, L.C. & Carneiro, J. 2007. *Basic Histology: Text and Atlas*. Disadur Jan Tambajong. *Histologi Dasar: Teks dan Atlas*. Edisi 10. Jakarta: EGC.
- Kabal-Dzik, A., Stojko, R., Szaflarska-Stojko, E., Wroblewska-Adamerk, I., Stojko, A., Stojko, J., and Stawiarska-Pieta, B. 2004. The Influence of Propolis Balm on The Healing Process of Experimentally Induced Burn Wounds. *Ann Aca Med Siles*. 58 (2): 111-15.
- Krell, R. 1996. *Value Added Products From Beekeeping: Propolis*. Chapter 5. United Nations Rome: FAO Agricultural Services.
- Kiristsy, C.P & Lynch, S.E. Role of Growth Factors in Cutaneous Wound Healing: A Review. *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine*. 4 (5):729-760.
- Kumar, V., Abbas, A.K., and Fausto, N. 2005. *Robbins and Contran: Pathologic Basis of Disease*. 7st Edition. Philadelphia: Elsevier Saunders Inc.
- Lawler, W., Ahmed, A., and Hume, W.J. 1992. *Essential Pathology for Dental Students*. Disadur Agus Djaya. *Buku Pintar Patologi untuk Kedokteran Gigi*. Jakarta: EGC.
- Lotfy, M. 2006. Biological Activity of Bee Propolis in Health and Disease. *Asian Pac J Cancer Prev*. 7: 22-31.
- Mirzoeva, O.K., Grishanin, R.N. and Calder, P.C. 1997. Antimicrobial Action of Propolis and Some of Component: the Effect of Growth, Membrane Potential and Mobility of Bacteria. *Mycrobiological Res.*, 1997, 152, 239-46.
- Moon, Y.J., Wang, X., and Morris, M.E. Dietary Flavonoids: Effect on Xenobic and Carcinogen Metabolism. *Toxicology in Vitro*. 20: 187-210.
- Macari, M.Z., Cavenaghi, F.M., Komesu, M.C., Lunardi, L.O., Sala, M.A., Junior, A.B.N., Grisi, M.F.M., Junior, M.T., and de Souza, S.L.S. 2005. Immune

Cell Depletion During Wound Healing as a Long Term Effect of Undernutrition. *Int. J. Morphol.* 23 (1): 25-32.

- Markham, K.R. 1988. *Technique Of Flavonoid Identification*. Disadur Kosasih Padmawinata. *Cara Mengidentifikasi Flavonoid*. Bandung: Penerbit ITB.
- Mawardi, H., Dalimi, L., dan Darmosumarto, S. 2002. Pengaruh Pemberian Ekstrak Propolis Secara Aplikasi Lokal pada Proses Pembentukan Serabut Kolagen Pasca Pencabutan Gigi Marmot (*Cavia Cobaya*). *Sains Kesehatan*. 15 (2): 171-183.
- Notoatmodjo, S. 2002. *Metodologi Penelitian Kesehatan*. Edisi Revisi. Jakarta: PT Rineka Cipta.
- Nurrohman, H., Daryanani, R., Astuti, L., Susanto, Sudiono, J., dan Roeslan, B. 2002. Efek Aplikasi Ekstrak jaringan *Achantina fulica* ke Dalam Soket Bekas Pencabutan Gigi terhadap Pembentukan Kolagen. *M.I. Kedokteran Gigi*. Edisi Khusus FORIL: 98-102.
- Pedersen, G.W. 1996. *Oral Surgery 1st Edition*. Disadur Purwanto & Basoeseno. *Buku Ajar Praktis Bedah Mulut*. Jakarta: EGC.
- Peterson, L.J., Ellis, E., Hupp, J.R., and Tucker, M.R. 1998. *Contemporary Oral and Maxillofacial Surgery*. 3rd Edition. St. Louis: Mosby-Year Book Inc..
- Pietta, P.G., Gardana, C., and Pietta, A.M. 2002. Analytical Methods or Quality Control of Propolis. *Fitoterapia*. 73 Suppl. 1: S7-S20.
- Porth, C.M. 1994. *Pathophysiology: Concept of Altered Health States*. Fourth Edition. Philadelphia: J.B Lippincott Company.
- Pratiknya, A.W. 2003. *Dasar-dasar Metodologi Penelitian Kedokteran dan Kesehatan*. Jakarta: PT. Raja Grafindo Persada.
- Price, S.A. & Wilson, L.Mc.C. 1994. *Pathophysiology, Clinical Concept of Disease Process*. Disadur Peter Anugerah. *Patofisiologi: Konsep Klinis Proses-Proses Penyakit*. Edisi 4. Jakarta: EGC.
- Purnami, T. 2003. Pengaruh Klorhexidin sebagai Obat Kumur terhadap Fibroblas pada Proses Penyembuhan Luka-Mukosa Rongga Mulut. *Jurnal Kedokteran Gigi Mahasaraswati*. 1 (3): 73-77.

- Purwanto, Syafridi, M., Yuwono, B., Novita, M., dan Cholid, Z. 1999. *Buku Ajar Bedah Mulut I*. Jember : Laboratorium Bedah Mulut FKG UNEJ.
- Rachmawati, N., Setyaningsih, W., Mandala, V., Dewi, M.S., dan Novita, G. 2006. *Re-epitelisasi, Kepadatan Fibroblast dan Serabut Kolagen pada Proses Penyembuhan Luka Gingiva Labial Tikus Sprangue dawley Setelah Pemberian Topikal Ekstrak Buah Adas (Foeniculum vulgare Mill.) 50%*. http://www.pkm.dikti.net/pkmiaward2006/pdf/pkmi/06_066.pdf [04 November 2007].
- Rao, K.S., Patil, P.A., and Malur, P.R. 2007. Promotion of Cutaneous Wound Healing by Famotidine in Wistar rats. *Indian J Med Res.* 125: 149-154.
- Reksoprodjo, S. 1995. *Kumpulan Kuliah Ilmu Bedah*. Jakarta: Binarupa Aksara.
- Robbins, S.L. & Kumar, V. 1995. *Basic Pathology 4th edition*. Disadur Staf Pengajar Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga. *Buku Ajar Patologi*. Jakarta: EGC.
- Robinson, T. 1995. *Kandungan Organik Tumbuhan Tinggi*. Disadur Kosasih Padmawinata. Bandung: ITB.
- Sabir, A. 2003. Pemanfaatan Flavonoid di Bidang Kedokteran Gigi. *Maj Ked Gigi (Dent J). Edisi Khusus Temu Ilmiah Nasional III* : 81-87.
- Sabir, A. 2005^a. Respon Inflamasi pada Pulpa Gigi Tikus setelah Aplikasi Ekstrak Etanol Propolis (EEP). *Maj Ked Gigi (Dent J)*. 38 (2): 77-83.
- Sabir, A. 2005^b. Aktivitas Antibakteri Flavonoid Propolis *Trigona sp* terhadap Bakteri *Streptococcus mutans* (in vitro). *Maj Ked Gigi (Dent J)*. 38 (3): 135-141.
- Sabir, A., Tabbu, C.R., Agustiono, P. and Sosroseno, W. 2005. Histological Analysis of Rat Dental Pulp Tissue Capped with Propolis. *Journal of Oral Science*. 47(3): 135-38.
- Sabiston, D.C. & Lyerly, H.K. 1994. *Buku Teks Ilmu Bedah: Penuntun Praktis Jilid I*. Jakarta: Binarupa Aksara.
- Sabiston, D.C. 1995. *Pocket Companion Textbook of Surgery*. Disadur Lyndon Saputra. *Buku Ajar Bedah Jilid I*. Jakarta: EGC.

- Saptoyono, B. 1996. Pengaruh Aplikasi Lokal Getah pisang pada Penyembuhan Luka Pasca Pencabutan Gigi *Cavia Cobaya*. *Maj Ked Gigi (Dent. J.)*. 29(1): 17-20
- Schroeder, H.R. 1991. *Oral Structural Biology*. Foreward by Max A. Listgarten. New York: Thieme Medical Publisher Inc.
- Scully, C.B.E. 2006. Propolis: a Background. *British Dental J.* 200 (7): 359-360.
- Sforcin, J.M., Kaneno, R., and Funari, S.R.C. 2002. Absence of Seasonal Effect on the Immunomodulatory Action of Brazillian Propolis on Natural Killer Activity. *J Venom Anim Toxins*. 8 (1).
- Singer, A.J., & Clark, R.A.F. 1999. Cutaneous Wound Healing. *The New England Journal of Medicine*. 341 (10):738-746.
- Sisa, J. 1996. *Apicultura Practica Y Medicinal*. <http://www.ecoaldea.com/>. [25 November 2007].
- Sjamsuhidajat, R. & de Jong, W. 1997. *Buku Ajar Ilmu Bedah*. Edisi Revisi. Jakarta: EGC.
- Sodera, V.K & Saleh, M. 1991. *Illustrated Handbook of Minor Surgery and Operative Technique*. Disadur Agung Wibawanto. *Ilustrasi Ilmu Bedah Minor*. Jakarta: Binarupa Aksara.
- Spector, W.G & Spector, T.D. 1993. *Pengantar Patologi Umum*. Edisi 3. Yogyakarta: Gajah Mada University Press.
- Stahl, E. 1985. *Analisis Obat secara Kromatografi dan Mikroskopi*. Bandung: Penerbit ITB.
- Steel, R.G.D. & Torrie, J.H. 1995. *Principle and Procedure of Statistic*. Disadur Bambang Sumantri. *Prinsip dan Prosedur Statistika*. Jakarta: Gramedia Pustaka Utama.
- Subiyantoro, S. 2002. Pengaruh Asap Rokok terhadap Pembentukan Fibroblas Pasca Operasi Mukosa Gingiva. *M.I. Kedokteran Gigi FKG UGM*. Edisi Khusus FORIL: 504-507.
- Supriyadi. 2004. "Efek Radiasi Ionisasi Dosis Tunggal terhadap Apoptosis Sel Fibroblas Jaringan Pulpa". Tidak Dipublikasikan. *Tesis*. Surabaya: Program Pascasarjana Universitas Airlangga.

- Susilo, B. 2007. Aktivitas Antimikroba Propolis dari Malang Jawa Timur terhadap *Staphylococcus aureus*. *Majalah Kedokteran Tropis Indonesia*. 18 (1):72-77.
- Syafriadi, M., Kusumawardani, B., Setyorini, D., Joelianto, R. 2006. *Petunjuk Praktikum Patologi Anatomi: Degenerasi dan Radang*. Jember: FKG Universitas Jember.
- Taheri, H.R., Rahmani, H.R., and Pourreza, J. 2005. Humoral Immunity of Broilers is Affected by Oil Extracted Propolis (OEP) in the Diet. *International Journal of Poultry Science*. 4 (6): 414-417.
- Tambajong, J. 1995. *Sinopsis Histologi*. Jakarta: EGC.
- Tjokronegoro, A & Sudarsono, S. 2004. *Metodologi Penelitian Bidang Kedokteran*. Edisi I. Jakarta: Balai Penerbit FK UI.
- Trusheva, B., Trunkova, D., and Bankova, V. 2007. Different Extraction Methods of Biologically Active Components from Propolis: a Preliminary Study. *Chemistry Central Journal*. 1 (13): 1-4.
- Valcic, S., Montenegro, G. Mujica, A.M., Avi, G., Franzblau, S., Singh, M.P., Maiese, W.M., and Timme, B.N. 1999. Phytochemical, Morphological, and Biological Investigations of Propolis Chile. *Verlag der Zeitschrift für Naturforshchung*. 54c: 406-16.
- Wang, C.Y., Tanii, I.N., and Stanchenko, P. 1997. Bone Resorptive Cytokine Gene Expression in Periapical lesion. *Oral Journal Microbiology and Immunology*. 12: 65-72.
- Widodo, A.H.B. 2005. Pengaruh Diabetes Mellitus terhadap Jumlah Fibroblas dan Kepadatan Serabut Kolagen Gingiva. *Maj Ked Gigi (Dent J)*. Edisi Khusus Temu Ilmiah Nasional IV: 326-330.
- Yaghoubi, S.M.J., Ghorbani, G.R., Soleimanian, Z.S., and Satari, R. 2007. Antimicrobial Activity of Iranian Propolis and Its Chemical Composition. *DARU*.15(1): 45-48.