

Agregasi Trombosit dan Laju Endap Darah pada Model Tikus Periodontitis

(Platelet Aggregation and Erythrocyte Sedimentation Rate of Periodontitis Rat Model)

Iman Santoso Adji¹, Rendra Christedy Prasetya², Suhartini², Dewa Ayu Susilawati²

¹Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember

²Bagian Biomedik Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember

Korespondensi: Iman Santoso Adji. Email: imansantoso.a@gmail.com

ABSTRACT

Background: Periodontitis is one of periodontal disease, which is an infection or inflammation of the periodontal tissues. Periodontitis patients exhibit risk of the number of fibrinogen circulation. Enhancement of fibrinogen levels is associated with systemic inflammation. The enhancement in blood eases erythrocytes and platelets aggregation. This condition was suspected that inflammation accompanied the erythrocyte sedimentation rate and platelet aggregation. **Objective:** To identify platelet aggregation level and erythrocyte sedimentation rate in periodontitis rat models. **Materials and Methods:** The animal models were divided into 4 groups: control group, P1 group with treatment for 14 days, P2 group for 21 days of treatment and P3 group for 28 days of treatment. Animal models were treated with *Porphyromonas gingivalis* injection and wire ligature at the left lower jaw in order to experience periodontitis. Platelet aggregation was observed by spectrophotometric and microscopic methods, while erythrocyte sedimentation rate used westegren method. **Results and conclusions:** There was significant increase the number of platelet aggregation and erythrocyte sedimentation rate (ESR) in periodontitis rat models.

Keywords: erythrocyte sedimentation rate, fibrinogen, platelet aggregation, periodontitis, systemic inflammation

Pendahuluan

Penyakit periodontal merupakan penyakit rongga mulut dengan prevalensi tinggi di dunia. Menurut WHO tahun 2006, prevalensi penyakit periodontal lebih dari 75%. Salah satu penyakit periodontal adalah periodontitis yang merupakan infeksi atau peradangan pada jaringan periodontal. Periodontitis juga merupakan penyakit multifaktorial, akan tetapi penyebab utamanya adalah koloni bakteri patogen seperti *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*). *P. gingivalis* banyak ditemukan dalam plak gigi dan bakteri tersebut menyebabkan perubahan patologik jaringan periodontal dengan pengaktifan respons imun dan inflamatori host, dan secara langsung

mempengaruhi sel-sel periodonsium. Salah satu produk *P.gingivalis*, adalah lipopolisakarida yang dapat masuk ke dalam jaringan periodontal kemudian menyebabkan periodontitis sehingga merusak pembuluh darah dengan mempengaruhi sel endotel, metabolisme lemak, dan peningkatan jumlah fibrinogen.¹

Orang dengan periodontitis berisiko mengalami peningkatan jumlah fibrinogen yang beredar dalam darahnya. Peningkatan kadar fibrinogen sering dihubungkan dengan inflamasi sistemik. Fibrinogen memiliki fungsi penting, yaitu membentuk bekuan darah pada proses koagulasi. Selain itu fibrinogen juga berfungsi meningkatkan viskositas darah, agregasi trombosit,

laju endap darah (LED), dan adhesi leukosit.² Peningkatan kadar fibrinogen dalam plasma darah menyebabkan eritrosit dan trombosit lebih mudah beragregasi sehingga menjelaskan mengapa inflamasi akan disertai dengan laju endap darah dan agregasi trombosit yang meningkat melalui pemeriksaan yang objektif.³

Pembuluh darah yang rusak akan menyempit dan melepaskan endotelin sehingga trombosit akan beragregasi pada tempat luka dan menarik platelet lain untuk menutup bocoran dengan sumbatan platelet. Agregasi trombosit merupakan suatu proses dimana trombosit akan saling melekat dengan trombosit lain. Proses agregasi trombosit memerlukan *adenosine diphosphate* (ADP), ion kalsium, dan fibrinogen. ADP merupakan penginduksi utama untuk agregasi trombosit, perubahan bentuk trombosit, dan sekresi trombosit.⁴

Laju endap darah (LED) disebut juga *erythrocyte sedimentation rate* (ESR) atau *sedimentation rate* (*sed rate*) atau *bezinking-snelheid der erythrocyten* (BSE) adalah kecepatan pengendapan sel-sel eritrosit di dalam tabung berisi darah yang telah diberi antikoagulan dalam waktu satu jam.^{5,6} Peningkatan nilai LED menunjukkan suatu proses inflamasi dalam tubuh seseorang, atau adanya kerusakan jaringan.⁶

Hubungan antara periodontitis, agregasi trombosit dan laju endap darah (LED) telah banyak diteliti secara observasional. Namun, hingga saat ini belum ada penelitian eksperimental menggunakan hewan coba yang telah dilakukan dan dapat menjelaskan hubungan sebab akibat antara periodontitis, agregasi trombosit dan laju endap darah (LED). Oleh karena itu peneliti melakukan penelitian eksperimental menggunakan hewan coba untuk

menganalisis agregasi trombosit dan laju endap darah (LED) pada model tikus periodontitis.

Metode Penelitian

Penelitian ini merupakan jenis penelitian eksperimen laboratoris dengan the post test only control group design.

Penelitian menggunakan tikus wistar jantan yang telah diadaptasikan selama 1 minggu sebelum perlakuan dan juga dilakukan pengukuran berat badan. Hewan coba dibagi menjadi 4 kelompok secara acak, dimana tiap-tiap kelompok terdiri dari 4 (empat) ekor tikus.

- 1) Kelompok P0 (Kontrol negatif) merupakan kelompok yang tidak diberi perlakuan.
- 2) Kelompok P1 merupakan kelompok yang diberi perlakuan injeksi 0,05 ml dengan konsentrasi 2×10^9 CFU/ml dan pemasangan *wire ligature* selama 14 hari.
- 3) Kelompok P2 merupakan kelompok yang diberi perlakuan injeksi 0,05 ml dengan konsentrasi 2×10^9 CFU/ml dan pemasangan *wire ligature* selama 21 hari.
- 4) Kelompok P3 merupakan kelompok yang diberi perlakuan injeksi 0,05 ml dengan konsentrasi 2×10^9 CFU/ml dan pemasangan *wire ligature* selama 28 hari.

Suspensi *P. gingivalis* diperoleh dari *P. gingivalis* ATCC 33277 yang ditanam pada TSA, kemudian ditumbuhkan selama 14 hari pada suhu 37°C dalam inkubator. Bakteri disubkultur dan diinkubasi selama 3 hari. Selanjutnya, dipanen dengan ose plastik steril dan dilarutkan dalam larutan salin. Penelitian pendahuluan menunjukkan bahwa, konsentrasi *P.gingivalis* yang digunakan untuk memicu periodontitis yaitu sebesar 2×10^9 CFU/ml yang sebanding dengan 6,67 standar McFarland.

Wire ligature berukuran

diameter 0,5 mm dipasangkan pada servikal gigi molar kiri rahang bawah. Pembuatan *wire ligation* dibentuk menyerupai huruf U menggunakan tang koil dilakukan dengan pencetakan pada model rahang tikus yang telah didekaputasi. Pemasangan *wire ligation* menggunakan pinset anatomis dan dipasang memeluk mesial dari molar tikus. *Wire ligation* ditekan kebawah agar tepat berada di servikal gigi, posisi akhir dari *wire ligation* adalah di atas sulkus gingiva agar tidak menyebabkan iritasi.

Tikus dipasangkan *wire ligation* dan injeksi *P.gingivalis* pada gigi molar pertama rahang bawah kiri tiga kali dalam seminggu selama 14 hari, 21 hari dan 28 hari. Tikus dipuasakan selama 10 jam sebelum dilakukan pengambilan darah di akhir penelitian. Tikus diambil dari kandang dan dianastesi dengan cara memasukkan tikus ke dalam tabung yang berisikan kasa yang telah dibasahi oleh chloroform hingga tikus hilang kesadaran.⁷ Setelah itu, hewan difiksasi sedemikian rupa dan dilakukan pembedahan torax sampai organ jantung terlihat. Kemudian, darah diambil secara intracardial menggunakan *disposable syringe* sebanyak ± 6 ml. Darah yang telah diambil dimasukkan dalam *vacuum tube* berisi antikoagulan EDTA.

Pemeriksaan agregasi trombosit dengan metode spektrofotometrik dan mikroskopik. Preparasi suspensi trombosit dengan mensentrifuse ± 5 ml darah dengan kecepatan 600 rpm selama 10 menit. Supernatan yang mengandung serum dan trombosit diambil, kemudian disentrifuse kembali dengan kecepatan 1700 rpm selama 10 menit. Pelet yang mengandung trombosit dicuci dengan HBSS sebanyak 2 kali. Maka didapatkan PPP (*platelet poor*

plasma) yang kemudian disuspensikan kedalam 2,5 ml HBSS. Suspensi trombosit dituang sebanyak 1 ml ke dalam *cuve* spektro. Pengukuran dengan panjang gelombang 334 nm menggunakan spektrofotometer dan didapat besar densitas optikal dengan satuan absorben (abs). Pengamatan mikroskopik menggunakan preparat suspensi trombosit yang dibuat dengan menuang 10 μ l suspensi trombosit pada objek glass menggunakan pipet mikro yellow tips. Buat hapusan dengan sekali gerakan sehingga suspensi trombosit terdistribusi rata pada permukaan objek glass. Lakukan fiksasi dengan methanol 2,5% selama 3 menit. Terakhir lakukan pengecatan dengan giemsa selama 10 menit dan bilas dengan air mengalir. Preparat suspensi trombosit siap dilakukan pemeriksaan menggunakan mikroskop *inverted* dengan perbesaran 1000x.

Pengukuran laju endap darah menggunakan metode Westgren. Prinsip dari metode ini adalah darah vena dan antikoagulan tertentu dimasukkan kedalam tabung tertentu dan dicatat kecepatan pengendapan dari eritrosit leukosit. Teknik pengukuran metode ini pertama-tama darah vena dengan EDTA diencerkan dengan larutan NaCl fisiologis 0,9% dengan perbandingan 1:4 kemudian dihisap kedalam tabung Westegen sampai tanda 0. Lubang atas tabung ditutup dengan jari lalu ditempatkan di rak Westegen dengan keadaan tepat vertikal, kemudian hasil dibaca setelah satu jam.

Data yang diperoleh kemudian dilakukan uji statistik parametrik *One Way ANOVA* untuk mengetahui ada tidaknya perbedaan antar kelompok. Dilanjutkan dengan uji *Least Significant Difference* dengan nilai

signifikansi $p < 0,05$ untuk membandingkan tiap variabel antara kelompok kontrol dengan kelompok periodontitis.

Hasil Penelitian Periodontitis pada Hewan Coba

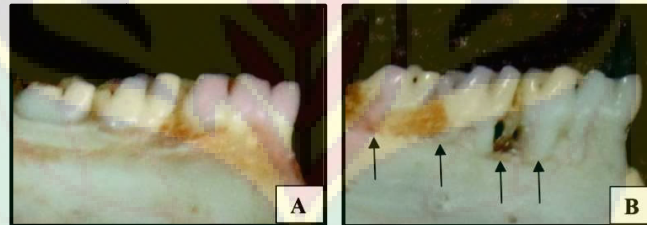
Hasil penelitian menunjukkan periodontitis pada hewan coba yang dapat dikonfirmasi dengan adanya resorpsi tulang alveolar secara horizontal. Pemeriksaan klinis menunjukkan terjadi resorpsi *alveolar crest* secara horizontal ke arah apikal pada rahang bawah kiri model tikus periodontitis (Gambar 1). Pemeriksaan radiologis menunjukkan adanya gambaran radiolusen pada daerah tulang alveolar rahang bawah kiri model tikus periodontitis (Gambar 2).

Agregasi Trombosit

Prinsip pemeriksaan agregasi

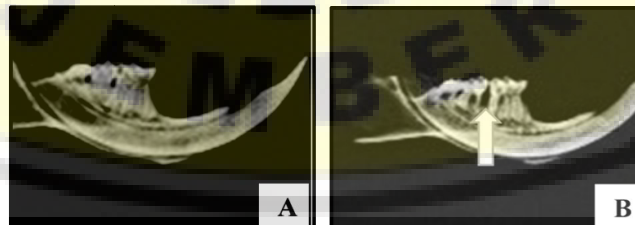
trombosit dengan metode spektrofotometrik ini adalah semakin rendah nilai *optical density* suspensi trombosit maka semakin tinggi nilai agregasi trombositnya. Hasil pemeriksaan agregasi trombosit menunjukkan rata-rata tingkat agregasi trombosit yang lebih tinggi pada kelompok perlakuan jika dibandingkan kelompok kontrol.

Kelompok P2 menunjukkan hasil pengukuran agregasi trombosit tertinggi disusul kelompok P3 dan kelompok P1. Hasil pemeriksaan agregasi trombosit hewan coba ditunjukkan pada tabel 1 dan gambar 3, sedangkan hasil pemeriksaan mikroskopik pada preparat suspensi trombosit untuk mengkonfirmasi terdapat adanya agregat trombosit ditunjukkan pada Gambar 4.



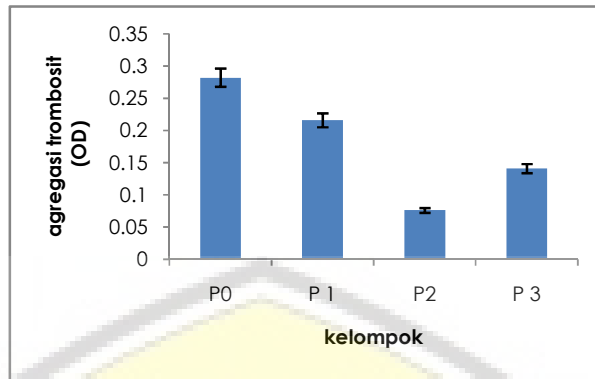
Gambar 1. Gambaran Klinis Tulang Alveolar Mandibula Kiri Hewan Coba.

Pada kelompok kontrol (A) tulang alveolar dalam keadaan normal yang ditandai dengan tulang alveolar yang tidak mengalami resorpsi. Pada kelompok periodontitis (B) menunjukkan adanya periodontitis yang ditandai posisi *alveolar crest* yang lebih ke apikal (tanda panah).



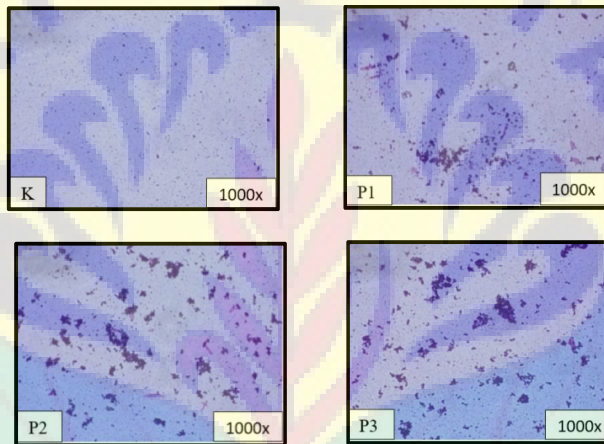
Gambar 2. Gambaran Radiografis Tulang Alveolar Mandibula Kiri Hewan Coba.

Pada kelompok kontrol (A) menunjukkan tulang alveolar dalam keadaan normal yang ditandai dengan tulang alveolar yang tidak mengalami resorpsi. Pada kelompok periodontitis (B) terlihat gambaran daerah radiolusen pada tulang alveolar (tanda panah) yang menunjukkan terjadinya periodontitis.

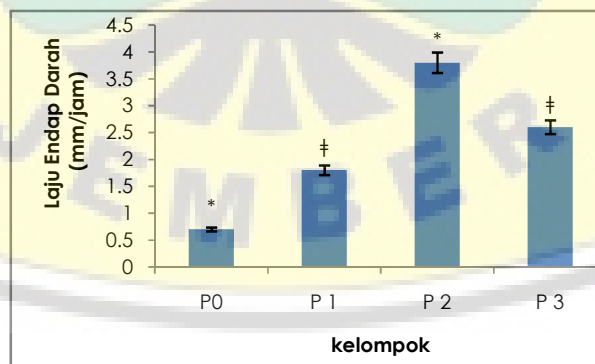


Gambar 3. Agregasi Trombosit

Data yang tersaji merupakan rata-rata dan simpangan baku; P0, kelompok control; P1, kelompok perlakuan selama 14 hari; P2, kelompok perlakuan selama 21 hari; P3, kelompok perlakuan selama 28 hari



Gambar 4. Gambaran Mikroskopis Agregasi Trombosit
(perbesaran 1000x)



Gambar 3. Laju Endap Darah

Data merupakan rata-rata dan simpangan baku; data dianalisis dengan one way varians dan Least significant different; P0, kelompok control; P1, kelompok perlakuan selama 14 hari; P2, kelompok perlakuan selama 21 hari; P3, kelompok perlakuan selama 28 hari; *, terdapat perbedaan yang bermakna antar semua kelompok; †, tidak ada beda antara P1 dan p3

Laju Endap Darah

Prinsip pengukuran laju endap darah dengan metode westgren adalah semakin cepat terjadi pengendapan sel darah merah selama satu jam maka semakin tinggi nilai laju endap darahnya. Hasil pemeriksaan laju endap darah menunjukkan rata-rata tingkat laju endap darah yang lebih tinggi pada kelompok perlakuan dibandingkan kelompok kontrol. Kelompok P1 menunjukkan peningkatan hasil pengukuran laju endap darah jika dibandingkan kelompok kontrol. Kelompok P2 menunjukkan nilai laju endap darah tertinggi. Kelompok P3 menunjukkan penurunan nilai laju endap darah dibandingkan kelompok periodontitis 2 namun tetap lebih tinggi dibandingkan kelompok kontrol, dan periodontitis 1. Hasil pemeriksaan laju endap darah kelompok kontrol dan kelompok periodontitis ditunjukkan pada tabel 2 dan gambar 5.

Hasil analisis statistik parametrik *one way anova* menunjukkan terdapat perbedaan pada seluruh kelompok penelitian. Hasil analisis data dengan uji LSD untuk agregasi trombosit menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang bermakna antar kelompok P0, P1, P2 dan P3. Hasil analisis data dengan uji LSD untuk agregasi trombosit menunjukkan bahwa terdapat perbedaan bermakna antar seluruh kelompok, kecuali antara kelompok P1 dan Kelompok P3 yang perbedaannya tidak bermakna.

Pembahasan

Pada penelitian ini terdapat dua parameter yang diamati, yaitu nilai agregasi trombosit dan nilai laju endap darah sebagai variabel terikat. Sampel darah yang digunakan pada penelitian ini berasal dari model tikus periodontitis

sebagai variabel bebas. Agregasi trombosit diamati untuk melihat ada tidaknya peningkatan nilai agregasi trombosit pada sampel plasma darah model tikus periodontitis. Laju endap darah diamati untuk melihat ada tidaknya peningkatan nilai laju endap darah pada sampel darah model tikus periodontitis. Penelitian ini mengamati peningkatan nilai agregasi trombosit dan laju endap darah dari kelompok kontrol dan tiga kelompok perlakuan yang dibedakan berdasarkan lama perlakuan yang diberikan pada hewan coba. Perlakuan berupa injeksi bakteri *P. gingivalis* dan pemasangan *wire ligation* yang mengakibatkan kondisi periodontitis dan menginduksi kondisi inflamasi sistemik pada hewan coba.

Kondisi inflamasi sistemik pada hari ke-14 menunjukkan terjadinya peningkatan kadar IL-6 dalam tubuh sebagai bentuk respon terhadap infeksi. Peningkatan kadar IL-6 tertinggi terjadi pada hari ke-21 yang ditandai dengan terjadinya atrofi jaringan. Pada hari ke-28 terjadi penurunan kadar IL-6 yang ditunjukkan dengan mulai terbentuknya kolagen sebagai tanda terjadinya proses perbaikan jaringan.⁸ IL-6 merangsang sintesis hepatik beberapa protein plasma, khususnya fibrinogen. Peningkatan kadar fibrinogen dapat menyebabkan eritrosit dan trombosit lebih mudah beragregasi.³

Agregasi trombosit merupakan kemampuan trombosit untuk saling melekat satu dengan yang lain dalam membentuk suatu sumbatan.⁹ Trombosit merupakan sel yang tidak berinti namun mitokondrianya mampu melepas *adenosine diphosphate* (ADP).¹⁰ ADP yang dilepaskan oleh trombosit dapat merangsang perlekatan antar trombosit. Hal ini diikuti dengan pelepasan isi granul yang dapat merangsang trombosit

lain untuk beragregasi. Selain ADPagen seperti epinefrin, kolagen, fibrinogen, trombin, kompleks imun dan faktor yang mengaktifasi trombosit (*platelet-activating factor*) dapat menginduksi agregasi trombosit.¹¹ Periodontitis atau infeksi periodontal dipercaya dapat menginduksi terjadinya inflamasi sistemik.¹² Proses inflamasi sistemik merangsang sistem hematopoetik terutama sumsum tulang untuk melepaskan leukosit dan trombosit serta merangsang hepar untuk meningkatkan produksi fibrinogen.¹³ Kadar plasma fibrinogen merupakan komponen penting dalam kaskade koagulasi darah. Fibrinogen berpengaruh kuat terhadap hemostasis, hemoorologi, agregasi trombosit, dan fungsi endotel. Sehingga merupakan salah satu faktor yang menentukan viskositas dan aliran darah.^{14,15} Pada kondisi inflamasi sistemik dalam keadaan stabil sekalipun terdapat peningkatan kadar petanda inflamasi sistemik termasuk fibrinogen.¹⁶

Peningkatan jumlah fibrinogen ini akan menyebabkan peningkatan viskositas plasma dan peningkatan agregasi trombosit serta eritrosit.¹⁷ Pada penelitian ini, nilai agregasi trombosit terendah terjadi pada kelompok kontrol. Hal ini dikarenakan hewan coba pada kelompok kontrol dalam keadaan sehat dan tidak menderita inflamasi sistemik. kelompok periodontitis 1 dengan lama perlakuan 14 hari terjadi peningkatan nilai agregasi trombosit karena kadar fibrinogen meningkat yang diinduksi oleh IL-6 sebagai bentuk respon dari kondisi inflamasi sistemik yang disebabkan oleh periodontitis. Peningkatan tertinggi nilai agregasi trombosit pada kelompok periodontitis 2 menunjukkan tingkat inflamasi sistemik tertinggi terjadi pada hari ke-21. Hal ini dikarenakan

peningkatan kadar IL-6 dan fibrinogen tertinggi terjadi pada hari ke-21. Terjadinya penurunan nilai agregasi trombosit pada kelompok periodontitis 3 diduga disebabkan oleh kondisi inflamasi sistemik yang menurun karena sudah memasuki fase perbaikan dan adaptasi di hari ke-28. Hal ini menyebabkan kadar IL-6 dan fibrinogen dalam plasma darah menurun sehingga tingkat agregasi trombosit juga menurun tetapi tetap lebih tinggi dari kelompok kontrol. Hasil penelitian menunjukkan kesesuaian dengan penelitian sebelumnya yang telah dilakukan oleh Ceri A.

Laju Endap Darah (LED) adalah kecepatan mengendapnya eritrosit dari suatu sampel darah yang diperiksa dalam suatu alat tertentu yang dinyatakan dalam mm/jam.¹⁸ Nilai LED dapat digunakan sebagai indikasi inflamasi dan meningkat pada berbagai penyakit.⁵ Nilai LED ditentukan oleh keseimbangan faktor prosedimentasi, terutama fibrinogen dan beberapa faktor penghambat sedimentasi yang disebut eritrosit bermuatan negative (zeta potensial). Saat terjadi inflamasi menyebabkan sel-sel darah merah bergerak saling mendekat dan menumpuk membentuk *rouleaux*. Hal ini menyebabkan sel darah merah menjadi lebih berat dan semakin cepat mengendap.¹⁹ Saat terjadi inflamasi, berbagai interleukin yang berasal dari sel granulosit yang mengalami kerusakan merangsang sel-sel hepar untuk meningkatkan produksi fibrinogen dan melepaskannya dalam plasma darah. Fibrinogen dapat membentuk lapisan tipis pada permukaan sel darah merah yang menyebabkan hilangnya muatan negatif pada permukaan eritrosit. Hal ini memicu sel darah membentuk *roulaeux* dan semakin berat sehingga lebih cepat mengendap menghasilkan

peningkatan nilai LED.^{20,21}

Hasil pengujian menunjukkan bahwa nilai LED terendah teramati pada kelompok kontrol. Hal ini dikarenakan hewan coba pada kelompok kontrol tidak mengalami inflamasi sistemik yang menginduksi peningkatan LED. Kelompok periodontitis 1 dengan lama perlakuan selama 14 hari menunjukkan peningkatan nilai LED yang lebih tinggi dari kelompok kontrol. Hal ini disebabkan oleh periodontitis yang menginduksi inflamasi sistemik pada hewan coba. kelompok periodontitis 2 dengan lama perlakuan selama 21 hari menunjukkan nilai LED yang tertinggi diantara seluruh kelompok. Hal ini disebabkan karena pada hari ke-21 kondisi inflamasi sistemik berada pada puncaknya ditandai dengan kadar IL-6 dan fibrinogen tertinggi yang menyebabkan hasil LED pada hari ke-21 tertinggi diantara semua kelompok. Kelompok periodontitis 3 dengan lama perlakuan 28 hari menunjukkan penurunan nilai LED jika dibandingkan dengan kelompok periodontitis 2. Hal ini mengindikasikan mulai terjadinya penurunan tingkat inflamasi sistemik pada hari ke-28. Pengukuran nilai agregasi trombosit dan nilai LED pada penelitian ini menunjukkan hasil yang seragam. Peningkatan terjadi pada hari ke-14 dan 21, sedangkan penurunan terjadi pada hari ke-28. Hal ini disebabkan oleh peningkatan kadar fibrinogen dalam plasma darah yang diinduksi oleh IL-6 sebagai bentuk respon inflamasi pada hari ke-14 dan terus meningkat hingga hari ke-21. Pada hari ke-28 mulai terjadi mekanisme perbaikan dan adaptasi sehingga menunjukkan nilai LED darah yang menurun, tetapi tetap berada diatas nilai normal. Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan, dapat disimpulkan bahwa terdapat peningkatan nilai agregasi trombosit

dan LED pada suatu kondisi inflamasi sistemik yang disimulasikan pada model tikus periodontitis.

Kesimpulan

Terdapat peningkatan yang bermakna nilai agregasi trombosit dan laju endap darah pada model tikus periodontitis. Akan tetapi, perlu dilakukan pengujian agregasi trombosit dengan metode lain yang menggunakan adenosine diphosphate (ADP) sebagai induktor supaya hasil yang didapat lebih akurat. Peneliti lain yang berminat dalam penelitian sejenis, disarankan untuk meneliti viskositas darah, peningkatan kadar fibrinogen, dan IL-6 pada model tikus periodontitis.

Daftar Pustaka

1. Carranza. Glickman's clinical periodontology. Edisi 10. Philadelphia: WB. Saunders Co; 2008.
2. HandayaniTW. Penilaian kadar fibrinogen pada subjek sindroma metabolik dan obesitas. (Tesis). Medan. Universitas Sumatra Utara; 2013.
3. Kumar Vi, Cotran RS, Robbins SL. Buku ajar patologi. Edisi 7. Jakarta: EGC; 2012.
4. Bridgen ML. *Clinical utility of erythrocyte sedimentation rate*. <http://www.aafp.org/afp/1999/1001/p1443.html>. 1999. Diakses pada 18 September 2016.
5. Nordenson NJ. White blood cell count and differential. http://www.Lifesteps.com/gm.Azoz/ency/white_blood_cell_count_and_differential.jsp. 2002. Diakses pada 18 September 2016].
6. Vogel HG. Drug discovery and evaluation, pharmacological assay. Edisi II. Berlin: Springer; 2002.

7. Kolondam BJ, Pokatong W, Tallei T. Kadar trigliserida dan kolestrol tikus wistas (*Rattus novergicus*) setelah konsumsi virgin coconut oil. *Biosaintifika*. 2008; (1): 35-44.
8. Ceri AF dan Gareth WJ. Interleukin-6 signaling drives fibrosis in unresolved inflammation. Dublin Ireland: Cell Press; 2014.
9. Despopoulos A dan Silbernagl S. Color atlas of physiology. Edisi V. New York: Stuttgart;2003.
10. Guyton AC dan Hall JE. Buku ajar fisiologi kedokteran. Edisi XI. Jakarta: EGC;2012.
11. Suliarni. Aktifitas faktor VII pada sepsis. Medan. Universitas Sumatra Utara; 2003.
12. Rose LF dan Mealey BL. Periodontics: medicine, surgery, and implants. Saint Louis: Elsevier Mosby;2004.
13. Yunita. Pengukuran kadar fibrinogen sebagai petanda inflamasi sistemik pada pasien penyakit paru obstruktif kronik. Aceh: Universitas Syiah Kuala; 2012.
14. McColl BW, Rothwell NJ, Allan SM. Inflamasi sistemik mengubah kinetika gangguan serebrovaskular persimpangan ketat setelah stroke eksperimental pada tikus. *J Neurosci*. 2008; 28(9):451-62.
15. Cheung EYL dan Bos MJ. Variation in fibrinogen FGG and FGA genes and risk of stroke-The Rotterdam study. *Thrombosis and Haemostasis*. 2008; 100(2): 308-313.
16. Gan WQ, Man SF, Senthilselvan A, Sin DD. Association between chronic obstructive pulmonary disease and systemic inflammation: a systematic review and a metaanalysis. *Thorax*. 2004;59:574-80.
17. Baron DN. Kapita selekta patologi klinik. Edisi 4. EGC: Jakarta;1990.
18. Depkes. Petunjuk teknis pemberantasan nyamuk penular penyakit demam berdarah dengue. Dirjen PPM-PLP. Jakarta: Depkes;1992.
19. Widmann FK. Tinjauan klinis hasil pemeriksaan laboratorium. Edisi IX. Penerjemah Siti Boediana KR. 1995.
20. Greenberg MS. Hematologic disease; *Burkets Oral Medicine*. Philadelphia: Lippincot; 1996.
21. Roitt IM dan Lehner T. *Immunology oral disease*. Edisi VII. Jakarta: EGC; 1998