

Pengaruh Penggunaan Krim Kombinasi Madu dan Propolis Terhadap Gambaran Histologi Jumlah Fibroblas Penyembuhan Luka Insisi pada Tikus Putih (*Rattus norvegicus*)

*The Effect of Honey and Propolis Combination Cream Towards Histological The Fibroblast Number in Incision Wound Healing of White Rats (Rattus norvegicus)*

Yuan Elsafitri<sup>1</sup>, Sagiran<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Mahasiswa Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Yogyakarta, <sup>2</sup>Bagian Bedah Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Yogyakarta

## ABSTRACT

Honey and propolis are used for medical purposes since ancient times. One of the common used is to wound healing treatment because honey and propolis well-known have anti-inflammatory property. Wound is a damage of normal skin integration and tissue, and the wound that common happened is incision. Combination of honey and propolis is expected to be an effective treatment in stimulating the fibroblast proliferation for wound connective tissues (collagenization) and wound reepitelization. The aim of this study is to examine the activity of combination cream from honey and propolis on the wound healing process of rats skin (*Rattus norvegicus*). This study is based on the microscopic observations by calculate the fibroblasts number.

The experiment used a Random True Experiment Design with Blind Method. The animal models using 25 adult Wistar strain rats (*Rattus norvegicus*), aged  $\geq 3$  months and weight 150 - 250 grams. The rats were divided into 5 groups (n=5), i.e: group A with incision wound that treated with honey cream; group B for negative control (base cream only); group C with incision wound that treated with

combination cream of honey and propolis; group D with incision wound that treated with propolis cream; and group E for positive control (Povidone iodine). The rats had got two skin incision (15mm x 1mm) made with a surgical knives on the dorsum and thigh. The wound care were treated every twice a days. After all of the wounds healed on the 13<sup>th</sup> day, the rats was terminated by cloroform, than the skin tissue were made to be slide using haematoxylin and eosin staining (HE), and then continued by the measurement of the fibroblasts number. Data were analyzed with One Way Anova test and Post Hoc Test to signify the difference between every single groups.

The results of this research proves that the combination cream of honey and propolis has an influence on incision wound healing. It is indicaded by the least amount of fibroblasts on maturation phase with the fibroblast number cells  $4,55 \pm 0,99$ . The conclusion is that the use of combination cream of honey and propolis support the acceleration of wound healing process more than the other groups.

**Keywords:** honey, propolis, cream, wound incision, wound healing, fibroblast



## INTISARI

Madu dan propolis telah digunakan untuk pengobatan sejak jaman kuno. Salah satu penggunaannya yang paling sering adalah untuk terapi penyembuhan luka, karena madu dan propolis diketahui memiliki sifat anti-inflamasi. Luka adalah kerusakan dari integrasi jaringan normal kulit, dan salah satu jenis luka yang sering terjadi adalah luka insisi. Kombinasi dari madu dan propolis diduga dapat menjadi terapi efektif dalam menstimulasi proliferasi fibroblas untuk menghubungkan jaringan luka (kolagenisasi) dan reepitelialisasi luka. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk menguji aktifitas dari krim kombinasi madu dan propolis dalam proses penyembuhan luka pada kulit tikus (*Rattus norvegicus*). Penelitian ini berlandaskan pada pengamatan mikroskopik dengan menghitung jumlah fibroblas.

Percobaan menggunakan *Random True Experiment Design* dengan *Blind Methode*. Hewan uji menggunakan 25 tikus dewasa galur Wistar (*Rattus norvegicus*), usia  $\geq 3$  bulan dan berat 150-250 gram. Tikus-tikus ini dibagi menjadi 5 kelompok (n=5), yaitu: kelompok A dengan luka insisi yang diterapi dengan krim madu; kelompok B sebagai kontrol negatif (diterapi dengan basis krim); Kelompok C dengan luka insisi yang diterapi dengan krim kombinasi madu dan propolis; kelompok D dengan luka insisi yang diterapi dengan krim propolis; dan kelompok E sebagai kontrol positif (diterapi dengan *Povidone iodine*). Tikus mendapat dua luka insisi (15mmx1mm) dengan menggunakan pisau bedah pada bagian punggung dan paha. Luka diterapi dua kali sehari. Setelah semua luka sembuh pada hari ke 13, tikus diterminasi dengan menggunakan kloroform, dan kemudian jaringan kulit dibuat preparat menggunakan pengecatan Hematoksilin dan Eosin (HE), dan kemudian dilanjutkan dengan penghitungan jumlah fibroblas. Data dianalisa dengan uji *One Way Anova* dan *Post Hoc Test* untuk melihat perbedaan pada setiap kelompok.

Hasil dari penelitian ini membuktikan bahwa krim kombinasi madu dan propolis memiliki pengaruh pada penyembuhan luka insisi. Hal ini ditunjukkan oleh jumlah fibroblas yang sedikit pada fase maturasi dengan jumlah sel fibroblas  $4,55 \pm 0,99$ . Dapat disimpulkan bahwa penggunaan krim kombinasi madu dan propolis mendukung percepatan proses penyembuhan luka lebih baik dibanding kelompok yang lain.

**Kata Kunci:** Madu, propolis, krim, luka insisi, proses penyembuhan luka, fibroblas

## Pendahuluan

Kulit merupakan pelindung tubuh dengan luas dan ketebalan yang beragam. Pada normalnya orang dewasa memiliki luas kulit satu 1,5 - 2 m<sup>2</sup> dengan ketebalan antara 1,5 – 5mm, tergantung umur, jenis kelamin, suhu, keadaan gizi, dan letak kulit<sup>10</sup>.

Kulit tersusun atas tiga lapisan utama, yaitu lapisan epidermis, dermis dan subkutis (*hypodermis*)<sup>11</sup>. Epidermis merupakan lapisan paling luar yang tersusun atas beberapa lapisan sel tipis dengan tingkat maturasi yang berbeda-beda. Epitel yang dimiliki epidermis mengalami empat fase kritis antara lain inflamasi, proliferasi, dan remodeling jaringan (maturasi). Fase inflamasi ditandai dengan vasokonstriksi atau pengerutan ujung pembuluh darah yang putus (retraksi) agar perdarahan berhenti. Pada fase ini trombosit keluar dari pembuluh darah dan saling menempel, terbentuk benang fibrin, dan terjadi pembekuan darah pada daerah yang mengalami luka. Kemudian sel mast keluar dan menghasilkan serotonin dan histamin yang akan meningkatkan permeabilitas kapiler sehingga terjadi eksudasi, penyerbukan sel radang, disertai vasodilatasi setempat yang menyebabkan edema dan pembengkakan (rubor, calor, dolor, tumor)<sup>10</sup>.

merupakan epitel berjenis gepeng (skuamosa) berlapis, dengan beberapa lapisan yang terlihat jelas<sup>4</sup>.

Lapisan selanjutnya adalah dermis yang merupakan jaringan ikat dengan ketebalan sekitar 0,05 mm. Fibroblas, sel mast, dan makrofag merupakan elemen seluler utama dari dermis<sup>4</sup>.

Selanjutnya, lapisan kulit yang terakhir adalah lapisan subkutis atau hipodermis yang merupakan lapisan kulit yang paling tebal dan terdiri atas jaringan adipose, jaringan penghubung, pembuluh darah, saraf dan limfe<sup>11</sup>.

Penyembuhan luka terdiri dari e

Fase selanjutnya adalah fase proliferasi yaitu proses dimana luka dipenuhi sel radang, fibroblas, dan kolagen, dan kemudian akan membentuk jaringan berwarna kemerahan dengan permukaan yang berbenjol halus yang disebut jaringan granulasi. Fase yang terakhir adalah fase maturasi dimana tubuh berusaha menormalkan kembali semua yang menjadi abnormal karena proses penyembuhan. Edema dan sel radang diserap, sel muda menjadi matang, kapiler baru menutup dan diserap kembali, kolagen yang berlebih diserap dan sisanya mengerut sesuai regangan yang ada<sup>10</sup>.

Fibroblas merupakan sel yang bertugas menyintesis komponen matrik ekstraseluler. Sebagai respon terhadap

cedera, fibroblas berproliferasi dan lebih aktif mensintesis komponen ekstrasel jaringan ikat<sup>7</sup>.

Semakin sempurna penyembuhan suatu luka, maka semakin sedikit jumlah fibroblasnya karena adanya fibroblas menunjukkan masih terjadinya proses penyembuhan luka<sup>7</sup>.

Madu merupakan produk alami yang memiliki manfaat dalam penyembuhan luka. Pada umumnya, madu murni yang ada dipasaran terdiri dari kurang lebih 40% glukosa, 40% fruktosa, 20% air, asam amino, vitamin biotin, asam aminocotinic, asam folat, asam pantotenat, piridoksin, tiamin, enzim invertase diastase, oksidase glukosa, katalase, mineral kalsium, zat besi, magnesium, fosfor dan kalium. Di samping itu, madu juga mengandung senyawa obat lainnya, antara lain minyak esensial, flavonoid, terpen, dan polifenol, tergantung pada tanaman dari mana serbuk sari diambil<sup>8</sup>.

Propolis sendiri adalah zat perekat kuat yang dikumpulkan dan digunakan oleh lebah untuk menutup lubang di sarang mereka dan melindungi pintu masuk terhadap pengganggu<sup>11</sup>.

Lebih dari 200 zat telah diidentifikasi di dalam propolis dari lokasi yang berbeda, termasuk diantaranya adalah asam fenolik, flavonoid, ester, diterpen, seskuiterpen, lignan, aldehida aromatik,

alkohol, asam amino, asam lemak, vitamin, dan berbagai mineral. Kandungan-kandungan ini membuktikan berbagai sifat biologis yang terkandung dalam propolis seperti antimikroba, antioksidan, anti-inflamasi, imunomodulator, menurunkan tekanan darah, penyembuhan, anestesi, antikanker, anti-HIV, anti-karies, dan lain sebagainya. Manfaatnya yang sangat baik sebagai agen anti-inflamasi dan penyembuhan disebabkan oleh kandungan flavonoid di dalamnya<sup>4</sup>.

### **Bahan dan Cara Kerja**

Penelitian ini menggunakan desain penelitian *True Experiment Design* atau ekpresimental sungguhan dengan *Post Test Only Control Group*. Penelitian menggunakan *Blind method*.

Subjek penelitian ini menggunakan tikus putih (*Rattus Norvegicus*) jantan galur *Wistar* sebanyak 25 ekor, berumur  $\geq$  3 bulan, dengan berat rata-rata 150-250 gram.

Hewan uji (tikus putih) dibagi menjadi 5 kelompok perlakuan dan masing-masing kelompok terdiri dari 6 ekor tikus (dengan satu tikus sebagai cadangan). Adapun perlakuan untuk hewan uji antara lain menggunakan : krim madu; krim propolis; krim kombinasi madu dan propolis, basis krim (kontrol negatif), *Povidone iodine* (kontrol positif). Variabel bebas dari penelitian antara lain kelompok

dengan terapi krim madu, krim propolis, dan krim kombinasi madu dan propolis. Variabel kontrol dari penelitian adalah kelompok terapi basis krim (kontrol negatif) dan kelompok terapi *Povidone iodine* (kontrol positif).

Tikus diinduksi luka insisi pada 2 tempat, daerah punggung dan pada atas, dengan panjang 15mm dan dalam 1mm. Selanjutnya tikus diberi terapi sesuai dengan kelompok masing-masing setiap 2x24 jam hingga luka insisi sembuh. Setelah luka pada tikus sembuh, tikus dimuliakan dan bekas luka yang telah terbentuk dieksisi lalu dimasukkan kedalam pot berisi formalin 10 %, kemudian dibawa ke bagian patologi anatomi FK UGM untuk dibuat preparat dengan pengecatan HE (Hematoxylin Eosin). Selanjutnya preparat diamati menggunakan mikroskop dengan perbesaran 100x. Untuk setiap preparat dilakukan pengulangan pada 30 lapang pandang.

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan UMY, dengan waktu penelitian selama 4 - 8 minggu (dimulai sejak perlakuan hingga pengamatan preparat).

### Hasil Penelitian

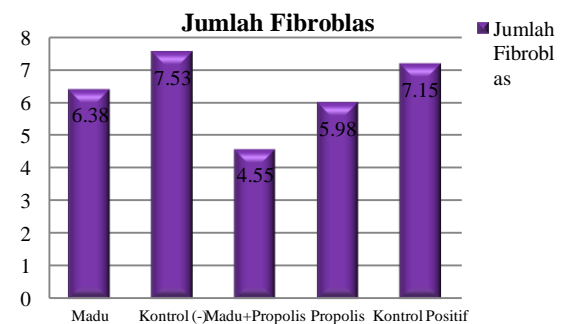
Pengamatan penyembuhan luka dilakukan dengan cara menghitung jumlah sel fibroblas pada preparat histologi

menggunakan mikroskop dengan perbesaran kuat pada 30 lapang pandang. Penyajian data hasil penghitungan jumlah fibroblas ditulis dengan menggunakan format mean.

Tabel. 1 Hasil Rata-rata Perhitungan Jumlah Fibroblas

Kelompok Penelitian	Mean	Standar Deviasi
Krim Madu	6,38	± 2,06
Kontrol Negatif (Basis Krim)	7,53	± 1,04
Krim Kombinasi Madu dan Propolis	4,55	± 0,99
Krim Propolis	5,98	± 2,49
Kontrol Positif ( <i>Povidone iodine</i> )	7,15	± 0,58

Grafik. 1 Perbandingan Jumlah Fibroblas



Pada tabel berdasarkan hasil uji *Homogeneous Subsets* dan *Descriptive Statistics* diatas diketahui bahwa krim kombinasi madu dan propolis memiliki jumlah fibroblas paling sedikit dengan nilai mean 4,55 dan standar deviasi ± 0,99.

Sebelumnya, jumlah sel fibroblas dianalisa dengan uji *Oneway Anova*,

dilakukan pengujian variasi data melalui uji distribusi (normalitas) data untuk memenuhi syarat penggunaan metode Oneway Anova. Hasil pengujian normalitas data dengan menggunakan uji *Kolmogorov-Smirnov* didapatkan hasil bahwa data untuk semua kelompok mempunyai sebaran normal dengan nilai  $p = 0,462$  ( $p > 0,05$ ). Pada tabel uji Oneway Anova didapatkan nilai  $p = 0,001$  ( $p < 0,05$ ) yang berarti data memiliki perbedaan yang signifikan. Analisis data perbedaan data antar masing-masing kelompok dari kelima kelompok dapat diketahui melalui uji *Post Hoc Multiple Comparison* dengan metode uji LSD (Least Square Distance).

Tabel. 2 Uji *Post Hoc Multiple Comparison* Jumlah Fibroblas

	A	B	C	D	E
A	-	0,114	<b>0,014</b> *	0,586	0,288
B	0,114	-	<b>0,000</b> *	<b>0,036</b> *	0,595
C	<b>0,014</b>	<b>0,000</b>	-	0,051	<b>0,001</b> *
D	0,586	<b>0,036</b>	0,051	-	0,111
E	0,288	0,595	<b>0,001</b>	0,111	-

A: Kelompok Krim Madu

B: Kelompok Kontrol Negatif

C: Kelompok Krim Kombinasi Madu dan Propolis

D: Kelompok Krim Propolis

E: Kelompok Kontrol Positif

\* Kelompok yang memiliki perbedaan yang signifikan ( $p < 0,05$ ).

Pada penelitian ini didapatkan data tambahan berupa kecepatan penyembuhan luka. Metode uji analisa data yang digunakan sama seperti data perbedaan jumlah fibroblas. Uji normalitas menunjukkan  $p = 0,114$  dan uji Oneway Anova menunjukkan hasil  $p = 0,002$ . Berikut hasil data kecepatan penyembuhan luka untuk setiap kelompok .

Tabel. 3 Hasil Rata-rata Waktu Kesembuhan Luka

Kelompok Penelitian	Mean	Standar Deviasi
Krim Madu	8,90	$\pm 1,10$
Kontrol Negatif (Basis Krim)	9,80	$\pm 1,32$
Krim Kombinasi Madu dan Propolis	8,80	$\pm 0,92$
Krim Propolis	9,70	$\pm 1,34$
Kontrol Positif ( <i>Povidone Iodine</i> )	7,90	$\pm 0,74$

Tabel. 4 Uji *Post Hoc Multiple Comparison* Waktu Kesembuhan Luka

	A	B	C	D	E
A	-	0,076	0,841	0,113	<b>0,049</b> *
B	0,076	-	<b>0,049</b> *	0,841	<b>0,000</b> *
C	0,841	<b>0,049</b>	-	0,076	0,076
D	0,113	0,841	0,076	-	<b>0,001</b> *
E	<b>0,049</b>	<b>0,000</b>	0,076	<b>0,001</b>	-

A: Kelompok Krim Madu

B: Kelompok Kontrol Negatif

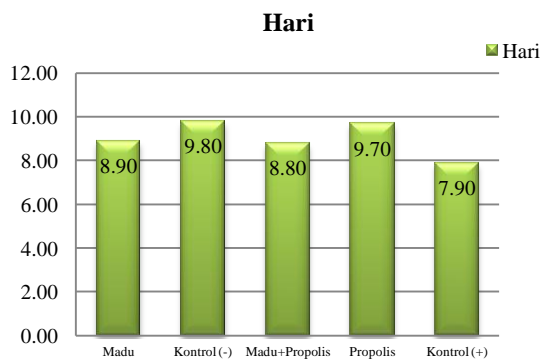
C: Kelompok Krim Kombinasi Madu dan Propolis

D: Kelompok Krim Propolis

E: Kelompok Kontrol Positif

\* Kelompok yang memiliki perbedaan yang signifikan ( $p < 0,05$ )

Grafik. 2 Perbandingan Waktu Kesembuhan



## Diskusi

Hasil penghitungan jumlah fibroblas pada penelitian ini didapat bahwa kelompok tikus dengan terapi krim kombinasi madu dan propolis menunjukkan hasil penyembuhan luka paling baik dengan parameter berupa jumlah fibroblas terhitung memiliki hasil paling sedikit pada fase maturasi. Kelompok ini diketahui menunjukkan perbedaan yang signifikan terhadap kelompok tikus dengan terapi krim madu, kontrol negatif (basis krim), dan kontrol positif (*Povidone iodine*). Akan tetapi kelompok tikus dengan terapi krim kombinasi madu dan propolis ini tidak memiliki perbedaan yang signifikan terhadap kelompok tikus dengan terapi krim propolis.

Madu mengandung glukosa oksidase, yaitu suatu enzim yang mengubah glukosa menjadi asam glukonat (asam organik bersifat antimikroba) dan hidrogen peroksida. Madu memproduksi hidrogen peroksida dalam kadar rendah dan tidak panas, serta memiliki kandungan katalase dan flavonoid yang memberikan efek antioksidan sebagai proteksi. Hidrogen peroksida ini juga berfungsi sebagai radikal bebas yang dapat membunuh bakteri. Pengaturan produksi hidrogen peroksida yang rendah dan efek proteksi antioksidan dari flavonoid inilah yang sangat penting untuk pertumbuhan sel seperti stimulasi angiogenesis dan pertumbuhan fibroblas<sup>8</sup>.

Kandungan gula yang tinggi pada madu memberikan keadaan hiperosmotik secara alami dan menyediakan energi untuk makrofag). Selain itu dengan tersedianya energi untuk makrofag, makrofag akan bekerja lebih cepat dalam memfagositosis dan mencerna organisme-organisme patologis dan sisa-sisa jaringan serta memproduksi TGF  $\beta$ . Selanjutnya TGF  $\beta$  akan memacu proliferasi dan migrasi sel-sel fibroblas dan mengubah fibroblas menjadi miofibroblas yang selanjutnya menyebabkan terjadinya gerakan centripetal kulit yang menguntungkan karena akan mengurangi area jaringan parut<sup>9</sup>.



Propolis memiliki kandungan bahan aktif flavonoid dan asam phenolat yang memberikan efek antioksidan (perusak radikal bebas) yang dapat meningkatkan suplai nutrisi, serta efek antiinflamasi. Propolis juga mengandung *caffeoylquinic acid* dan CAPE. *Caffeoylquinic acid* ini dapat meningkatkan motilitas dan penyebaran makrofag<sup>7</sup>. Makrofag ini nantinya akan memproduksi TGF  $\beta$  yang akan memacu proliferasi dan migrasi sel-sel fibroblas dan mengubah fibroblas menjadi miofibroblas<sup>9</sup>.

CAPE (*Caffeid Acid Phenethyl Esther*) sendiri akan menstimulasi produk TGF- $\beta$ 1 dimana diketahui bahwa TGF- $\beta$ 1 adalah molekul fisiologis yang multipoten, bersifat meregulasi pertumbuhan dan perkembangan juga menginduksi penyembuhan luka dan regenerasi jaringan<sup>10</sup>.

Hasil dari uji *Homogeneous Subsets* dan *Descriptive Statistics* dapat membuktikan bahwa penggunaan krim kombinasi madu dan propolis memiliki pengaruh terhadap penyembuhan luka insisi, dengan cara membandingkan hasilnya dengan kelompok obat standar yaitu *Povidone iodine*. Disamping itu krim kombinasi madu dan propolis juga memiliki jumlah fibroblas paling sedikit dengan jumlah fibroblas  $4,55 \pm 0,99$  sel jika dibandingkan dengan kelompok yang lain.

## Kesimpulan

Hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa penggunaan krim kombinasi madu dan propolis memberikan pengaruh terhadap penyembuhan luka insisi dengan parameter membandingkan hasil jumlah fibroblas kelompok krim kombinasi madu dan propolis terhadap kelompok kontrol positif (*Povidone iodine*) yang merupakan obat standar dengan nilai  $p = 0,001$  ( $0 < 0,05$ ).

Pemberian terapi krim kombinasi madu dan propolis juga memberikan perbedaan hasil yang bermakna dibandingkan pemberian terapi krim madu, kontrol negatif (basis krim), dan kontrol positif (*Povidone iodine*), namun tidak memiliki dengan pemberian terapi krim propolis. Dapat diketahui pula bahwa kelompok terapi krim kombinasi madu dan propolis memberikan gambaran penyembuhan luka secara mikroskopis paling baik dengan jumlah fibroblas paling sedikit pada fase maturasi (fase penyempurnaan) dibandingkan kelompok yang lain ( $4,55 \pm 0,99$  sel),

## Saran

Mengingat baik madu maupun propolis memiliki kandungan bahan aktif yang banyak dan bermacam-macam, perlu dilakukan penelitian mengenai reaksi kerja antara kedua bahan tersebut dan penelitian baru mengenai dosis kombinasi yang

paling efektif. Selain itu, perlu dilakukan penelitian lebih lanjut dengan menggunakan bahan sediaan lain.

### Daftar Pustaka

1. Adi, P., Silviana, N. M., Sari, P. K. 2013. *Perbandingan Efek Bahan Pelapik Mineral Trioxide Aggregate (MTA) dengan Propolis terhadap Respon Ekspresi DMP1 pada Sel Odontoblas*. Karya Tulis Ilmiah Strata Satu. Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Malang
2. Agarwal, G., Vemanaradhya, G.G., Mehta, D.S. 2012. *Evaluation of chemical composition and efficacy of Chinese propolis extract on Porphyromonas gingivalis and Aggregatibacter actinomycetemcomitans: An in vitro study*. Diakses Juli-September 2012, dari <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3532784/>
3. Batista, L.L.V., Campesatto, E.A., de Assis, M.L.B., Barbosa, A.P.F., Grillo, L.A.M., Dornelas, C.B. 2012. *Comparative study of topical green and red propolis in the repair of wounds induced in rats*. Diakses 23 Juli 2012, dari <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Comparative+study+of+topical+green+and+red+propolis+in+the+repair+of+wounds+induced+in+rats>
4. Brown, R. G., Burns, T. (2005). *Lecture Notes Dermatologi*. Edisi kedelapan. Jakarta : Erlangga (8-9)
5. Halim, E. 2011. *Kajian Kandungan Bioaktif dan Zat Gizi Propolis serta Efek Imunomodulator terhadap Sel T CD8+ pada Pasien Kanker Payudara*. Karya Tulis Strata Dua. Program Studi Magister Manajemen Ketahanan Pangan Institut Pertanian Bogor. Bogor
6. Januarsih, I. A. R. dan Atik, N. 2010. *Perbandingan Pemberian Topikal Aqueous Leaf Extract of Carica Papaya (ALEC) dan Madu Khaula Terhadap Percepatan Penyembuhan Luka Sayat pada Kulit Mencit (Mus musculus)*. Bagian Histologi Fakultas Kedokteran Universitas Padjadjaran. Bandung
7. Junqueira, L.C., Carneiro, J., Kelly, R.O. (2007). *Histology Dasar*. Edisi 10. Jakarta : EGC
8. Nakajima, Y., Nakano, Y., Fuwano, S., Hayashi, N., Hiratoko, Y., Kinoshita, A., et al. 2013. *Effects of Three Types of Japanese Honey on Full-Thickness Wound in Mice*. Diakses 20 Januari 2013, dari <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3563239/>
9. Prabakti, Y. 2005. *Perbedaan Jumlah Fibroblas di Sekitar Luka Insisi pada Tikus Putih yang Diberi Infiltrasi Penghilang Nyeri Levobupivakain dan yang Tidak Diberi Levobupikain*. Karya Tulis Ilmiah Strata Dua. Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro. Semarang
10. Sjamsuhidajat, R., & De Jong, wim. (2005). *Buku Ajar Ilmu Bedah*. Jakarta : EGC
11. Wasitaatmadja, S.M. (2005). *Ilmu Penyakit Kulit dan Kelamin*. Edisi Keempat. Jakarta : FK UI