

PERBEDAAN KADAR *MATRIX METALLOPROTEINASE-8* SETELAH *SCALING* DAN PEMBERIAN TETRASIKLIN PADA PENDERITA PERIODONTITIS KRONIS

(The difference of Matrix metalloproteinase-8 levels after scaling and tetracycline addition of chronic periodontitis)

Melok Aris Wahyukundari

Departemen Periodonsia
Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga
Surabaya – Indonesia

ABSTRACT

Matrix metalloproteinase, especially MMP-8 is the key indicator related to periodontitis. MMP-8 is present in the Gingival Crevicular Fluid (GCF) of the patient suffered from periodontitis. The aim of the study was to compare the reduction of MMP-8 levels between the results of scaling, with and without tetracycline gel 0.7%, applied on chronic periodontitis. The samples were collected from the patients having chronic periodontitis and the patients with healthy periodontium as a control group. The GCF and whole saliva were taken before and 14 days after treatment. The GCF and saliva of the control group were taken from volunteer with healthy periodontium. The MMP-8 level was counted by ELISA test method (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) with ELISA reader instrument (ng/ml). The non-parametric statistic analysis of Kruskal-Wallis test was used to compare the MMP-8 levels of chronic periodontitis and health control. The paired T test was used to compare the MMP-8 value before and after treatment, and independent sample T test to compare the reduction of MMP-8 value between scaling and combination treatment of scaling-tetracycline gel in GCF. This study showed that the MMP-8 level of chronic periodontitis was higher than that of healthy person. Tetracycline showed a tendency to reduce the value of MMP-8 GCF in the first 14 days.

Keywords: *Matrix metalloproteinase-8, Scaling, tetracycline, gingival crevicular fluid (GCF), chronic periodontitis.*

Korespondensi (*correspondence*) : Melok Aris Wahyukundari, Departemen Periodonsia, Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga, Jln. Prof. Dr. Moestopo No. 47 Surabaya 60132, Indonesia.

PENDAHULUAN

Penyakit periodontal banyak diderita oleh manusia hampir di seluruh dunia dan mencapai 50% dari jumlah populasi dewasa.^{1,2} Menurut hasil survai kesehatan gigi dan mulut di Jatim tahun 1995, penyakit periodontal terjadi pada 459 orang diantara 1000 penduduk dan lebih banyak di pedesaan daripada perkotaan.³ Di Asia dan Afrika prevalensi dan intensitas penyakit periodontal terlihat lebih tinggi daripada di Eropa, Amerika dan Australia. Di Indonesia

penyakit periodontal menduduki urutan ke dua utama yang masih merupakan masalah di masyarakat.

Penyakit yang menyerang pada gingiva dan jaringan pendukung gigi ini merupakan penyakit infeksi yang serius dan apabila tidak dilakukan perawatan yang tepat dapat mengakibatkan kehilangan gigi.⁴ Penumpukan bakteri plak pada permukaan gigi merupakan penyebab utama penyakit periodontal. Penyakit periodontal dimulai dari

gingivitis yang bila tidak terawat bisa berkembang menjadi periodontitis dimana terjadi kerusakan jaringan pendukung periodontal berupa kerusakan fiber, ligamen periodontal dan tulang alveolar.

Jaringan periodontal tersusun dari komponen matriks ekstraseluler yaitu kolagen yang berperan dalam proses regenerasi dan kerusakan jaringan. Kolagen interstisial jaringan periodontal berfungsi untuk penyembuhan dan pembentukan jaringan baru. Penyakit periodontal didefinisikan sebagai penyakit yang kehilangan struktur kolagennya pada daerah yang menyangga gigi, sebagai respon dari akumulasi bakteri pada jaringan periodontal, tapi patogenesis secara molekular masih belum jelas. Matriks metalloproteinase (*MMPs*) diduga berperan secara bermakna pada penyakit periodontal ini.⁵ *MMPs* adalah famili dari zinc metalloproteinase yang terkait secara bersama menurunkan kebanyakan komponen matriks ekstraseluler.⁶ *MMPs* merupakan enzim proteolitik dimana dalam proses proteinasinya yang diperlihatkan melalui patogen periodontal yang terinfeksi, akan mengaktifkan *MMPs* inaktif sehingga terlibat dalam degradasi makromolekul matriks ekstraseluler, termasuk juga terlibat dalam degradasi ligamentum periodontal.⁷

Proses penyembuhan ini secara enzimologi bisa digambarkan dengan adanya penurunan kadar *MMP-8* yang berperan aktif dalam patogenesis periodontitis. *MMP-8* dikenal dominan dan bentuk paling umum dari penyakit periodontal.² *MMP* terlibat dalam degradasi matriks kolagen interstisial ekstraseluler. *MMPs* yang diduga berperan dalam banyak proses perubahan fisiologis dan patologis misalnya arthritis, invasi kanker dan metastasis, glomerulonephritis, arteriosclerosis, ulser jaringan, termasuk dalam penyakit periodontal, terlibat dalam degradasi ligamen periodontal.⁵ *MMP-8* disebut juga enzim kolagenase yaitu enzim yang dapat memecah kolagen pada peristiwa remodeling jaringan. Enzim *MMP-8* ini dihasilkan oleh bakteri penyebab kelainan periodontal yang berpotensi merusak jaringan penyangga gigi dengan cara merusak kolagen tipe I.⁸

Kolagenase adalah peristiwa untuk memecah kolagen yang dianggap penting pada proses terjadinya penyakit periodontal dan mengaktifkan *MMPs* untuk mengawali atau mempercepat degradasi kolagen ligamen periodontal.⁵

MMPs adalah suatu enzim proteolitik yang mempengaruhi degradasi dari makromolekul matriks ekstraseluler, yaitu kolagen interstisial dan kolagen membrana basalis, fibronektin, laminin dan proteoglikan.⁹ *MMPs* disintesis dan disekresi dalam

suatu bentuk proenzim inaktif. Pemecahan proteolitik dari gugus-amino pada rantai propeptida diperlukan untuk membangkitkan enzim aktif.¹⁰ Secara alami muncul penghambat *MMPs* yaitu *tissue inhibitor matriks metalloproteinase (TIMP)*, kontrol yang penting terhadap setiap aksi dari *MMPs*. Secara fisiologis, *MMP-8* dan penghambatnya telah ada dalam jaringan periodontal, namun bila tak ada keseimbangan antara *MMP-8* dengan *TIMP* maka akan terjadi peristiwa patogen pada jaringan periodontal, dimana jumlah *MMP-8* akan meningkat dan terjadi degradasi matriks ekstraseluler.⁶

Untuk menghilangkan plak dan dental deposit dilakukan perawatan *scaling*. Diharapkan setelah perawatan *scaling* akan terjadi proses penyembuhan berupa hilangnya peradangan dalam jaringan ikat gingiva dan terbentuknya *long junctional epithelium*. Proses penyembuhan ini secara histologis tidak menunjukkan adanya perlekatan jaringan ikat baru.¹¹ Penggunaan tetrasiklin golongan antibiotik dalam terapi penyakit periodontal telah dimodifikasi secara kimia sebagai obat antimikrobia, antikolagenase dan anti inflamasi.¹² Penggunaan sebagai anti kolagenase telah mampu menghalangi *MMP-8* dan dapat menurunkan progresi radang periodontal dan menghambat hilangnya tulang alveolar.² Tetrasiklin sebagai anti kolagenase digunakan 16 mg/ml mampu menghambat aktifitas kolagenase kurang lebih 90% sedangkan ampisilin pada konsentrasi yang sama ternyata tidak efektif menghambat enzim kolagenase.¹³ Pemberian tetrasiklin dapat menghantarkan suatu konsentrasi yang dapat diterima 10 hari pada sedikitnya 640 mg obat/ml pada cairan di dalam sulkus.¹⁴

Tetrasiklin dapat mengikat ion kalsium dan ion Zn yang terletak di sisi aktif dari enzim kolagenase. Hambatan pada enzim kolagenase menghasilkan efek antiproteolitik yang dapat menghambat resorpsi tulang.¹⁵

Secara biokompatibilitas penggunaan tetrasiklin telah diteliti dalam bentuk tetrasiklin gel dengan konsentrasi 0,7 % yang dapat diterima jaringan dan dapat menghilangkan lapisan smir, membuka tubuli dentin dan membuka matriks kolagen.¹⁶

Gingival crevicular fluid (GCF) telah digunakan untuk mendeteksi atau mendiagnosa penyakit aktif atau untuk memprediksi pasien dengan resiko penyakit periodontal. Sumber kolagenase yang mungkin didapat dari fibroblas atau *PMN*, atau yang berasal dari sekresi bakteri bisa didapatkan di dalam *GCF*. Obat-obatan yang diekskresikan melalui *GCF*

dapat digunakan dengan menguntungkan dalam terapi periodontal.¹⁷ Pada penelitian dengan subyek anjing menunjukkan bahwa tetrasiklin diekskresikan melalui *GCF*. Konsentrasi tetrasiklin dalam *GCF* lebih tinggi ketika dibandingkan dalam serum.¹⁸

Tujuan penelitian ini untuk menganalisa perbedaan kadar *MMP-8* hasil perawatan *scaling* tanpa dan dengan pemberian tetrasiklin pada periodontitis kronis. Untuk itu dilakukan pengukuran kadar *MMP-8 GCF* sebelum dan sesudah perawatan baik dengan *scaling* maupun dengan kombinasi *scaling*-tetrasiklin topikal dan menganalisa perubahan kadar *MMP-8* sebelum dan sesudah perawatan. Penelitian ini bermanfaat untuk memberikan informasi bagi praktisi bahwa tetrasiklin sebagai anti kolagenase dalam penyembuhan penyakit periodontal disamping sebagai anti mikrobial dan anti inflamasi.

BAHAN DAN METODE

Jenis penelitian ini adalah eksperimental *Randomized Clinical Trial (RCT)* dengan menggunakan *the pre-post test control group design*. Subyek penelitian terdiri dari 18 sukarelawan dengan periodontitis kronis yang terbagi menjadi 2 kelompok, terdiri dari 8 orang dengan perawatan skaling dan 8 orang dengan perawatan kombinasi *scaling*-tetrasiklin topikal.¹⁹ Kriteria subyek, dewasa berusia 30-50 tahun, mempunyai kedalaman poket periodontal 5 mm, tidak memiliki kelainan sistemik, tidak sedang mengonsumsi obat yang dapat menimbulkan gangguan metabolisme (misal: obat-obat kontrasepsi, obat-obatan untuk diabetes mellitus, antibiotik dalam 2 minggu terakhir) dan tidak dibedakan jenis kelamin pria dan wanita.

Bahan penelitian berasal dari *GCF* subyek sehat dan subyek periodontitis yang diambil sebelum dan sesudah perawatan. Pengambilan *GCF* dengan menggunakan metode pencucian (*washing methode*).²⁰ Setelah berkumur dan menyikat gigi, regio yang akan diambil *GCF* nya, dikeringkan dan diblokir dengan *cotton pellet*. *Disposable polypropylene tips* steril berisi larutan *phosphate buffer saline* steril 10 ml, disemprotkan ke dalam krevikular gingiva, kemudian disedot kembali. Tahap ini diulangi lagi sebanyak tiga kali pada satu gigi, agar seluruh komponen *GCF* diharapkan dapat tersedot semua ke dalam *disposable polypropylene tips*. Kemudian dipindahkan dalam *disposable polypropylene tube* steril dan segera disimpan dalam freezer dengan suhu -40°C. Setelah sampel terkumpul semua, selanjutnya dilakukan pengukuran kadar *MMP-8* dengan metode *ELISA*

(*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*), dengan menggunakan bahan reagen/KIT *MMP-8* (Kode produk: RPN2619, *Matrix Metalloproteinase-8 (MMP-8, Neutrophil Collagenase), Human, Biotrak ELISA System, by Amersham Biosciences*) dan metode sandwich *ELISA*.

Setelah penghentian reaksi saat pemeriksaan *ELISA*, segera dilakukan pemeriksaan dengan *ELISA Reader* dengan panjang gelombang 450 nm maksimal dalam waktu 30 menit. Melebihi waktu 30 menit akan terjadi perubahan warna pada sampel, sehingga akan mempengaruhi hasil akhir pembacaan *ELISA Reader*. Angka-angka yang keluar dari *ELISA Reader* adalah angka-angka absorbent yang masih harus di setarakan dengan bantuan grafik standar yang dibuat setelah dilakukan pemeriksaan dengan *ELISA Reader* sehingga menjadi angka-angka dalam bentuk kadar *MMP-8* (ng/ml).

Hasil absorbent *ELISA* yang telah disetarakan dengan kadar *MMP-8* ditabulasi menurut kelompok sampel masing-masing, kemudian diuji statistik dengan menggunakan *Kolmogorov-Smirnov Test*, untuk menguji normalitas data masing-masing kelompok. *Paired Samples T Test*, untuk uji dua kelompok sampel yang berhubungan (sampel berpasangan) pada kelompok sebelum dan sesudah perawatan *scaling* serta kelompok kombinasi *scaling*-tetrasiklin. *Independent Samples T Test*, yang terdiri dari *F test (Levene's test)* dan *t-test*, untuk uji beda dua kelompok penurunan kadar *MMP-8* (kelompok perawatan *scaling* dan kelompok pemberian tetrasiklin).

Pengambilan sampel pada subyek penelitian dengan *informed consent* dan telah disetujui oleh Komite Etik. Pengambilan sampel *GCF* dilakukan di RSGM FKG UNAIR dan pemeriksaan sampel secara *ELISA* dilakukan di *Tropical Disease Center (TDC)* UNAIR Surabaya.

HASIL

Enam belas pasien dengan periodontitis kronis telah diambil *GCF*nya untuk pemeriksaan kadar *MMP-8* sebelum dan sesudah perawatan *scaling* atau kombinasi *scaling*-tetrasiklin gel secara topikal. Hasil rerata pengukuran kadar *MMP-8* pada kelompok indikasi perawatan skaling dan pemberian tetrasiklin sampel *GCF* dapat dilihat di tabel 1.

Kadar *MMP-8 GCF* sesudah *scaling* lebih tinggi dibandingkan sebelum *scaling*, tetapi tidak ada perbedaan bermakna antara sebelum dan sesudah perawatan *scaling*. Dan rerata kadar *MMP-8* sesudah

Tabel 1. Nilai rerata kadar *MMP-8* sebelum dan sesudah perawatan pada sampel *GCF* (rata-rata \pm standart deviasi)

GCF	Skaling	Tetrasiklin
Sebelum	0.070 \pm 0.074	1.768 \pm 1.780
Sesudah	0.078 \pm 0.127	0.036 \pm 0.040
	$p=0.889$	$p=0.029^*$

GCF, gingival crevicular fluid,

* , perbedaan bermakna

tetrasiklin lebih rendah dibandingkan sebelum tetrasiklin. Terdapat perbedaan yang sangat bermakna antara rata-rata kadar *MMP-8* sebelum dan sesudah pemberian tetrasiklin gel secara topikal.

Hasil rerata perubahan kadar *MMP-8* periodontitis kronis sampel *GCF* dihitung dari selisih (Δ) sebelum dan sesudah perawatan skaling ditunjukkan dalam tabel 2.

Tabel 2. Nilai perubahan kadar *MMP-8* periodontitis kronis setelah perawatan pada sampel *GCF*

Group	N	Rata-Rata \pm SD
Δ Skaling	8	0.029 \pm 0.158
Δ Tetrasiklin	8	1.732 \pm 1.793*

Δ Skaling, selisih kadar *MMP-8* sebelum dan sesudah perawatan skaling;

Δ Tetrasiklin, selisih kadar *MMP-8* sebelum dan sesudah perawatan dengan pemberian tetrasiklin gel 0.7%; N, jumlah sampel; SD, Standart Deviasi; *, perbedaan bermakna.

Dari tabel 2, nilai rerata perubahan kadar *MMP-8* periodontitis kronis sampel *GCF*, perubahan kadar *MMP-8* setelah perawatan *scaling* lebih rendah dibandingkan perubahan kadar *MMP-8* setelah perawatan dengan pemberian tetrasiklin gel 0.7%.

Dari hasil perhitungan uji F menunjukkan bahwa perubahan kadar *MMP-8* setelah perawatan skaling dan perubahan kadar *MMP-8* setelah perawatan dengan pemberian tetrasiklin gel 0.7% pada *GCF* adalah berbeda bermakna. Artinya, terdapat perubahan kadar *MMP-8* yang besar sekali pada perawatan dengan pemberian tetrasiklin gel 0.7%, dibandingkan dengan perawatan skaling. Hal ini ditunjukkan dengan penurunan kadar *MMP-8* secara

bermakna setelah perawatan dengan pemberian tetrasiklin gel 0.7%.

PEMBAHASAN

Walaupun penyebab utama penyakit inflamasi periodontal adalah bakteri, tidak ditemukan adanya patogen penyebab tunggal.²¹ Enzim *MMP-8* yang dihasilkan oleh host dan bakteri dapat merusak jaringan periodontal. Struktur protein utama dari jaringan ikat gingival dan ligamen periodontal adalah kolagen dan proteoglikan. Tanda awal dan persisten dari penyakit periodontal adalah kerusakan jaringan ikat yang terbentuk dari protein ini yang diserang oleh protease yang berasal dari bakteri atau *hospes*.²² Bakteri yang berhubungan dengan penyakit periodontal dapat memproduksi berbagai enzim proteolitik yang ikut berperan pada kerusakan jaringan, yaitu; kolagenase dari spesies *Bacteroides*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans* dan *Spirochaeta*.²³ Pada subyek sakit produk kolagenase pada leher gingiva yang inflamasi atau poket periodontal tentu berbeda dalam aktifitas dan kadarnya pada leher gingival dan poket periodontal yang sehat.

Poket periodontal yang dalam pada periodontitis kronis merupakan tempat yang baik untuk aktifitas bakterial dan segala proses kolagenase yang diperankan oleh produk bakteri patogen berupa enzim-enzim kolagenase dan produk-produk inflamasi antara lain *PMN*, dan kolagenase yang berasal dari jaringan fibroblast, sehingga dapat meningkatkan *MMP-8* yang tidak diimbangi dengan aktifitas penghambat jaringan.

Skaling adalah metode paling konservatif dari reduksi poket bila poket dangkal atau bila periodontitis kronis masih dalam tahap awal. Skaling efektif dalam mengurangi inflamasi gingiva dan kedalaman poket. Skaling juga dapat merubah komposisi bakterial dari poket, yang kesemuanya nanti akan dapat menghambat aktifitas kolagenase jaringan periodontal dan menurunkan kadar *MMP-8*. Namun laju terbentuknya kembali koloni bakteri dipengaruhi oleh standar kebersihan mulut karena untuk pertumbuhan ulang plak supragingiva diperlukan rekolonisasi dari poket.²⁴ Relaps dapat terjadi pada beberapa pasien walaupun upaya skaling dilakukan dengan akurat. Jelas terlihat di sini bahwa kerentanan pasien terhadap penyakit periodontitis merupakan salah satu penyebab, tetapi juga jelas terlihat bahwa sangat sulit untuk dapat membersihkan semua deposit kalkulus dari poket yang dalam dengan

scaling subgingiva yang tidak terkontrol. Beberapa penelitian menunjukkan bahwa beberapa kalkulus tetap akan tertinggal setelah *scaling* dilakukan sangat cermat dan insidens ini biasanya meningkat bersama dengan makin dalamnya poket tersebut.²⁵

Upaya kemoterapi untuk perawatan periodontal, antara lain pemakaian tetrasiklin sebagai satu-satunya cara perawatan periodontitis kronis atau dalam kombinasi dengan *scaling*, sebagai alat bantu yang akan dapat meningkatkan efek perawatan. Tetrasiklin memiliki sifat non anti mikrobal yang memodulasi host.²⁶ Berkaitan dengan hal tersebut, tetrasiklin menghambat aktifitas ekstraseluler kolagenase osteoblast dan neutrofil mamalia. Aktifitas matriks metalloproteinase ini nampaknya berperan dalam kerusakan kolagen, yang merupakan komponen sebagian besar jaringan ikat periodontal. Tetrasiklin yang mempunyai efek kolagenase ini, dapat menurunkan level enzim kolagenase neutrofil (*MMP-8*) yang banyak diproduksi saat keadaan patogen.

Tetrasiklin untuk merawat penyakit periodontal dapat diberikan baik secara sistemik maupun lokal. Metode lokal kelihatannya lebih cocok untuk mendapatkan konsentrasi lokal yang tertinggi dan untuk mengurangi resiko terjadinya resistensi terhadap bakteri dan juga adanya efek samping maupun interaksi diantara obat-obatan yang dipakai.²⁷ Sulitnya menjangkau daerah poket, merupakan kendala yang sulit dipecahkan pada pemakaian tetrasiklin. Untuk mengurangi kendala tersebut maka tetrasiklin yang diaplikasikan ke dalam poket berupa gel, dengan menggunakan suatu alat (*syringe*) dengan kecepatan lambat yang dapat dimasukkan dokter gigi ke dalam poket, sampai dasar poket.

Pada perawatan dengan pemberian tetrasiklin gel ke dalam poket periodontal memberikan perubahan kadar *MMP-8* yang besar sekali, sehingga diperoleh kadar *MMP-8* yang turun setelah perawatan. Perawatan ini sangat efektif untuk patologi periodontal dengan kedalaman poket dalam dengan adanya kehilangan perlekatan klinis. Pemberian tetrasiklin untuk mengontrol langsung terhadap aktifitas kolagenase *MMP-8* pada poket periodontal. Selain itu, tetrasiklin untuk membantu meningkatkan keefektifan perawatan dan memperlambat progresi proses penyakit tersebut, terhadap pasien yang tidak berespon terhadap perawatan yang hanya secara mekanis *scaling* saja.²⁸ Tetrasiklin yang diberikan ke dalam poket periodontal ini, mencapai konsentrasi yang lebih tinggi dalam cairan krevikular daripada di dalam

serum, yaitu dengan cara mengikat substansi yang mengandung kalsium.²⁹

Berdasar pada hasil penelitian yang telah dilakukan, dapat disimpulkan bahwa tetrasiklin gel 0.7% efektif menurunkan kadar *MMP-8 GCF* dalam 14 hari pertama ketika digunakan sebagai tambahan pada perawatan periodontal yang berupa *scaling*.

DAFTAR PUSTAKA

1. Carranza FA, Newman MG. Clinical Periodontology. 7th ed Philadelphia: WB. Saunders Co 1990; pp. 74.
2. Teronen, YT. Konttinen, C. Lindqvist, *et al.* Human neutrophil collagenase MMP-8 in peri-implant sulcus fluid and its inhibition by clodronate. J Dent Res, 76(9) 1997; 1529-1537.
3. Departemen Kesehatan RI. Jawa Timur dalam angka. Laporan Survey kesehatan rumah tangga 1996; hal 52-54.
4. The American Academy of Periodontology, 2002. Gum disease information. Do you have periodontal disease? <http://www.perio.org/consumer/2a.html>. 1-3.
5. DeCarlo A Jr, Windsor L, Bodden M.K., *et al.* Activation and Novel processing of Matrix Metalloproteinase by a Thiol-proteinase from the oral anaerob porphyromonas gingivalis. J Dent Res 76(6): 1260-1270, June 1997.
6. Hayakawa, Taro. Matrix Metalloproteinases (MMPs) and Tissue Inhibitors of Metalloproteinases (TIMPs) in the development and disease of oral tissues: Special article: Dentistry in Japan 1998: 34:167-173.
7. Hansen HB. Proteolytic remodelling of extracellular matrix. Current opinion of cell biology. Jun (5) 1995:728-735.
8. Rams ET, Slots J. Systemic and antimicrobial therapy in periodontics, Periodontol 2000 1996; 10:139-154.
9. Ingman T., Ding, *et al.* Matrix metalloproteinase and their inhibitors in gingival crevicular fluid and saliva of periodontitis patients. Journal of Clinical Periodontology 1996; 23:1127-1132.
10. Kusakawa J, Sasaguri Y, Kameyama T. Expression of Matrix Metalloproteinase-3 in stage I and II Squamous Cell Carcinoma of the Oral Cavity. J Oral axillofac Surg 1995; 53:530-534.

11. Carranza FA, Newman MG. *Clinical Periodontology*. 8th ed. Philadelphia: WB. Saunder Co. 1996 *In*: Maduratna, Ernie. Biokompatibilitas gel tetrasiklin hidroklorida dan pengaruhnya terhadap terlepasnya lapisan smir pada permukaan akar (Tesis) 1999; 1.
12. Tsukuda N. The influence of doxycycline on the attachment of fibroblasts to gelatin-coated surfaces and its cytotoxicity. *J Peridontol* 1993; 64:1219-1224.
13. Golub LM, Ramamurthy N, McNamara, TF, *et al*. Tetracyclin inhibit tissue collagenase activity. A new mechanism in the treatment of periodontal disease. *J Periodont Res* 1984; 19:651-655.
14. Goodson, JM, Offenbacher S, Farr DH, Hogan PE. Periodontal disease treatment by local drug delivery. *Journal Periodontology* 1985; 56:265-272. *In*: Tsukuda N. The influence of doxycycline on the attachment of fibroblasts to gelatin-coated surfaces and its cytotoxicity. *J Peridontol* 1993; 64:1219-1224.
15. Seymour RA, Heasman PA. Pharmacological control of periodontal disease. II. Antimicrobial Agent. *J Dent* 23 1995;5-14.
16. Maduratna, Ernie. Biokompatibilitas gel tetrasiklin hidroklorida dan pengaruhnya terhadap terlepasnya lapisan smir pada permukaan akar (Tesis) 1999, 55.
17. Carranza FA, Newman MG. *Clinical Periodontology*. 9th ed Philadelphia: WB. Saunders Co 2000; pp. 36-73, 254-260, 500, 682.
18. Bader HJ, Goldhaber P. The passage of intravenously administered tetracycline in the gingival sulcus of dog. *J Oral Ther*. 1996;2:324 *In*: Carranza FA, Newman MG. *Clinical Periodontology*, 9th ed Philadelphia: WB. Saunders Co. 2000; 256-257.
19. Steel RGD, Torrie JH, 1980. Prinsip dan prosedur statistika. Suatu pendekatan biometrika. Terjemahan Bambang S., Gramedia Jakarta 1989; Hal. 145-147.
20. Soerodjo TS. Respon imun humoral terhadap streptococcus mutans sehubungan dengan karies gigi. Disertasi, Universitas Airlangga, Surabaya 1989.
21. Lang, N.P., Cumming, B.R., and Löe, H. Toothbrushing frequency as it relates to plaque development and gingival health. *Journal of Periodontology* 44, 1973; 396.
22. Page, P.C. and Schroeder, H.E. Pathogenesis of inflammatory periodontal disease. A summary of current work. *Laboratory Investigation* 1976; 33, 235.
23. Robertson, P.B., Lantz, P.T. Marucha, K.S. *et al*. Collagenolytic activity associated with *Bacteroides* species and actinomycetes. *Journal of Periodontal Research* 1982; 17, 275.
24. Magnusson, I., Lindhe, J., Yoneyama, T. *et al*. Recolonisation of the subgingival microbiota following scaling in deep pockets. *Journal of Clinical Periodontology* 11, 1984; 193. *In*: J.D. Manson and B.M. Eley. *Outline of periodontics*. Butterworth & Co. (Publishers) Ltd 1989. Alih bahasa: Anastasia S. Buku ajar periodonti. Penerbit Hipokrates 1993; 157.
25. Eaton, K. A., Kieser, J. B. and Davies, R. M. The removal of root surface deposits. *Journal of Clinical Periodontology* 12, 1985; 141 *In*: J.D. Manson and B.M. Eley. *Outline of periodontics*. Butterworth & Co. (Publishers) Ltd, London. Alih bahasa: Anastasia S. 1993. Buku ajar periodonti. Penerbit Hipokrates, Jakarta 1989; 159.
26. Vernillo, Ramamurthy, Lorne M., Golub, and Rifkin. The nonantimicrobial properties of tetracycline of periodontal disease. *Current Opinion in Periodontology* 1994: 111-118.
27. Slots J. and Rams T.E. Antibiotic in periodontal therapy: advantages and disadvantages. *Journal Clinical Periodontology*. 17, 1990; 479-493.
28. Greenstein Gary. Nonsurgical periodontal therapy in 2000 : A literature review. *JADA* 131, 2000; 1580-1589.
29. Baker, P. J., Coburn, R. A. *et al*. Tetracycline and its derivatives strongly bind to and are released from the tooth surface in an active form. *Journal of Periodontology* 54, 1983; 580. *In*: J.D. Manson and B.M. Eley. *Outline of periodontics*. Butterworth & Co. (Publishers) Ltd 1989; Alih bahasa: Anastasia S. Buku ajar periodonti. Penerbit Hipokrates 1993; 166.