

EVALUASI JARINGAN DALAM STUDI *IN VIVO* PEMBERIAN EKSTRAK PROPOLIS PADA MODEL LUKA INFEKSIWinona May Hendrata¹, Willy Sandhika², Agung Dwi Wahyu Widodo³¹Mahasiswa Program Studi Kedokteran, Fakultas Kedokteran, Universitas Airlangga²Departemen Patologi Anatomi, Fakultas Kedokteran, Universitas Airlangga³Departemen Mikrobiologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Airlangga**ABSTRACT**

Background: Infection in wound could lead to various consequences including scarring and occurrence of sepsis. With increasing prevalence of resistant strain bacteria, option for treating infected wound need to be constantly expanded. Propolis, a product of honey bee, is a potential treatment which has been studied to have various effects including antibacterial, anti-inflammatory, and antioxidant. **Objective:** The study aims to assess the effect of propolis toward wound healing, by evaluating wound macroscopic and microscopic appearance. **Material and method:** Propolis extract were made using maceration technique using ethanol. Thirty *Rattus norvegicus* male rats were divided into six groups: three groups for treatment and three groups for control. Incision wound were made in the back and was infected with *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA). Propolis was administered orally on daily basis. Wound excision for observation were done on day 3, 5, and 7. The tissue were processed using haematoxylin-eosin (HE) staining for microscopic observation. The distance of normal tissue surrounding the wound were measured using image analysis program. **Result:** Macroscopic observation showed fewer visible wound in the propolis extract treated group. Measurement by microscopic observation on day 3 also demonstrated more narrow wound width in propolis extract treated group ($405.75 \pm 110.11 \mu\text{m}$) compared to the control group ($806.20 \pm 644.41 \mu\text{m}$). **Conclusion:** The result of this study suggests that propolis extract by oral administration promotes the healing of infected wound as shown within microscopic and microscopic observation.

Keywords: Animal model, propolis, wound healing, wound infection

ABSTRAK

Latar belakang: Infeksi pada luka dapat menyebabkan berbagai komplikasi, seperti terbentuknya jaringan parut hingga terjadinya sepsis. Karena peningkatan prevalensi galur bakteri yang resisten, pilihan terapi untuk mengobati luka infeksi senantiasa perlu diperluas. Propolis, suatu produk lebah madu, adalah salah satu terapi potensial yang telah diteliti memiliki beberapa efek seperti efek antibakteri, antiinflamasi, dan antioksidan. **Tujuan:** Penelitian ini bertujuan mengkaji efek propolis terhadap penyembuhan luka, dengan mengevaluasi penampakan makroskopik dan mikroskopik luka.

Metode dan materi: Ekstrak propolis dibuat dengan teknik maserasi menggunakan etanol. Tiga puluh ekor tikus *Rattus norvegicus* jantan dibagi menjadi enam kelompok: tiga kelompok untuk perlakuan dan tiga kelompok sebagai kontrol. Luka insisi dibuat di daerah punggung tikus dan diinfeksi oleh *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA). Propolis diberikan secara per-oral setiap hari. Eksisi luka untuk pengamatan dilakukan pada hari ke-3, 5, dan 7. Jaringan diproses dengan menggunakan pewarnaan hematoksin-eosin (HE) untuk pengamatan mikroskopis. Jarak jaringan normal yang menggapit luka diukur dengan aplikasi analisis gambar. **Hasil:** Pengamatan makroskopis menunjukkan lebih sedikit sampel dengan luka yang masih tampak pada kelompok perlakuan dengan ekstrak propolis. Pengukuran pada pengamatan mikroskopis juga menunjukkan jarak lebar luka yang lebih sempit pada kelompok perlakuan dengan ekstrak propolis pada hari ke-3 ($405,75 \pm 110,11 \mu\text{m}$) dibandingkan dengan kelompok kontrol ($806,20 \pm 644,41 \mu\text{m}$). **Simpulan:** Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa pemberian ekstrak propolis melalui jalur oral dapat meningkatkan penyembuhan luka infeksi dari pengamatan makroskopis dan mikroskopis.

Kata kunci: Model hewan coba, propolis, penyembuhan luka, infeksi luka

Korespondensi: Winona May Hendrata, Jl. Prof DR. Moestopo 47 Surabaya, Jawa Timur, Indonesia
+6281234000099, email: winonamayh@gmail.com

Latar belakang

Infeksi pada luka merupakan suatu masalah yang dapat menyebabkan mortalitas dan morbiditas tinggi. Selain itu perawatan luka yang diperberat dengan infeksi membutuhkan biaya yang lebih tinggi hingga dapat memberatkan beban finansial pada pasien maupun tenaga kesehatan (Järbrink, *et al.*, 2016). Studi menunjukkan bahwa 90.8% luka operasi mengalami infeksi (Giacometti, *et al.*, 2000). Infeksi menyebabkan penyembuhan luka menjadi kronis. Sebagai *porte de entry* bakteri dari lingkungan, luka kronis yang tidak lekas sembuh berisiko menimbulkan sepsis dan sembuh dengan pembentukan *scar* (Ogawa, 2017). Dengan bertambahnya penemuan bakteri yang resisten terhadap antibiotik yang ada, tantangan mengobati luka infeksi menjadi makin berat. Salah satu spesies bakteri yang sering menimbulkan infeksi pada luka adalah *Staphylococcus aureus* (Giacometti, *et al.*, 2000).

Propolis adalah suatu bahan yang diproduksi oleh lebah madu (*Apis mellifera*) (Wagh, 2013). Di seluruh dunia propolis dipakai sebagai obat tradisional untuk mengobati beberapa penyakit, salah satunya adalah luka pada kulit (Kuropatnicki, *et al.*, 2013). Propolis mengandung beragam fenol dan flavonoid dari tanaman. Kandungan inilah yang diperkirakan membuat propolis memiliki efek antibakterial dan antioksidan yang poten (Al-Waili, *et al.*, 2012; Valente, *et al.*, 2011). Indonesia, sebagai salah satu negara penghasil madu terbesar di dunia (Toreti, *et al.*, 2013), memiliki potensi untuk mengembangkan produk terapeutik yang berbahan dasar propolis.

Penelitian terdahulu telah menunjukkan efek propolis terhadap penyembuhan luka akut maupun kronis (Hozzein, *et al.*, 2015; Pillai, *et al.*, 2010; Lotfy, *et al.*, 2006; Siqueira, *et al.*, 2010). Dalam mempelajari penyembuhan luka, pengamatan dengan metode histopatologi sangat penting untuk mengetahui proses-proses yang terjadi pada jaringan. Hingga saat ini masih belum ada penelitian yang mengaji tentang pengaruh propolis terhadap penyembuhan luka yang terinfeksi.

Tujuan

Penelitian ini bertujuan untuk mengaji pengaruh ekstrak propolis per-oral terhadap luka infeksi pada model hewan coba dengan evaluasi secara makroskopis dan mikroskopis.

Metode dan materi

Propolis dikeringkan dengan oven dan dihaluskan menjadi bubuk. Ekstraksi dilakukan dengan merendam bubuk propolis dalam etanol 96% selama 72 jam dan dilanjutkan dengan pengeringan menggunakan *rotary evaporator* dengan suhu 55°C. Sebelum pemberian per-oral pada tikus, ekstrak propolis dilarutkan terlebih dahulu dengan konsentrasi 180 mg/ml (w/v) dalam akuades.

Perlakuan hewan coba dalam penelitian ini dilakukan di Unit Hewan Coba Departemen Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga. Penelitian ini menggunakan 30 ekor tikus putih Wistar (*Rattus norvegicus*) berkelamin jantan dengan berat antara 250-300 g. Aklimatisasi tikus dalam kandang dilakukan selama 7 hari. Hewan coba dibagi secara acak ke dalam 6 kelompok. Pembuatan luka dilakukan dengan membuat insisi sepanjang 2 cm pada punggung tikus yang telah dicukur. Setelah perdarahan pada luka berhenti, luka diinokulasi dengan 1 ml medium yang mengandung 10^5 cfu/ml *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA) yang didapatkan dari Departemen Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga. Setelah penginfeksi dengan MRSA, luka tikus ditutup dengan kasa untuk menghindari infeksi yang tidak diinginkan.

Tiga kelompok diberi propolis dengan dosis 720 mg/kg berat badan yang selanjutnya disebut sebagai kelompok perlakuan, sedangkan tiga kelompok lainnya diberi air yang selanjutnya disebut sebagai kelompok kontrol. Pemberian pada seluruh hewan coba dilakukan setiap hari selama perlakuan dan diberikan dengan sonde melalui lubang hidung.

Pada hari ke 3, 5, dan 7 satu kelompok perlakuan dan satu kelompok kontrol dikorbankan untuk dilakukan pengamatan. Setelah euthanasia dengan menggunakan teknik *cervical dislocation*, kulit tikus yang mengandung luka dilakukan eksisi dan difiksasi dengan *neutral buffer formalin* selama 24 jam. Selanjutnya, jaringan eksisi dibuat menjadi blok paraffin. Bagian tengah dari panjang luka diiris dan dilakukan pewarnaan HE untuk dilakukan pengukuran lebar luka.

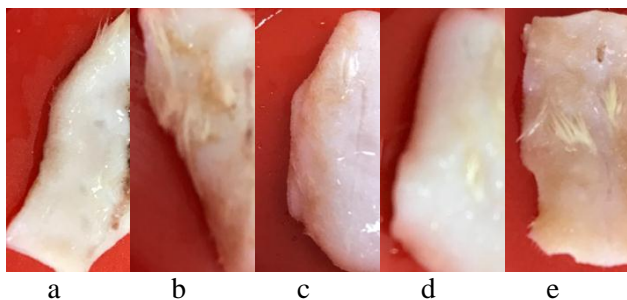
Foto mikroskopis diambil dengan perbesaran 40x menggunakan kamera dan mikroskop cahaya (Olympus CX33) yang telah dikalibrasi. Pengukuran penutupan luka dilakukan dengan menggunakan aplikasi Fiji (Schindelin, *et al.*,

2012) dengan menarik garis setingkat epidermis dari tepi salah satu jaringan sehat, melewati luka, dan berakhir pada tepi jaringan sehat yang lain. Pengukuran pada aplikasi telah disesuaikan dengan kalibrasi kamera. Spesimen yang lukanya telah tertutup oleh jaringan epidermis panjang luka diberi nilai 0 μm .

Hasil

Penampakan luka secara makroskopis

Dari penampakan makroskopis luka pada hari observasi, luka diklasifikasikan menjadi tampak (+) dan tidak tampak (-) (Tabel 1). Klasifikasi luka yang tampak meliputi luka yang masih terbuka, luka yang dilapisi oleh lapisan epitel, dan luka yang masih tampak kontraksinya. Sedangkan luka yang tidak tampak meliputi bagian kulit yang sudah tampak mulus dan bagian kulit yang telah ditumbuhi oleh rambut (Gambar 1).



Gambar 1. Macam penampakan luka pada hewan coba; a. Luka terbuka, b. Luka dilapisi oleh lapisan epitel, c. Tampak kontraksi luka, d. Tidak ada sisa luka, e. Area luka telah ditumbuhi rambut.

Tabel 1. Penampakan luka pada setiap kelompok

Kelompok	Hari pengamatan	n	Luka (+)	Luka(-)
Perlakuan	3	5	4	1
Kontrol	3	5	5	0
Perlakuan	5	5	4	1
Kontrol	5	5	5	0
Perlakuan	7	5	2	3
Kontrol	7	5	3	2

Pada seluruh hari pengamatan, di kelompok perlakuan dengan propolis terdapat lebih banyak jumlah luka yang tidak tampak dibandingkan dengan kelompok kontrol. Jumlah luka tampak dan tidak tampak pada pengamatan hari ke-3 dan hari ke-5 sama, namun tampak peningkatan

jumlah dengan luka tidak tampak pada pengamatan hari ke-7 (Tabel 1).

Lebar luka secara mikroskopis

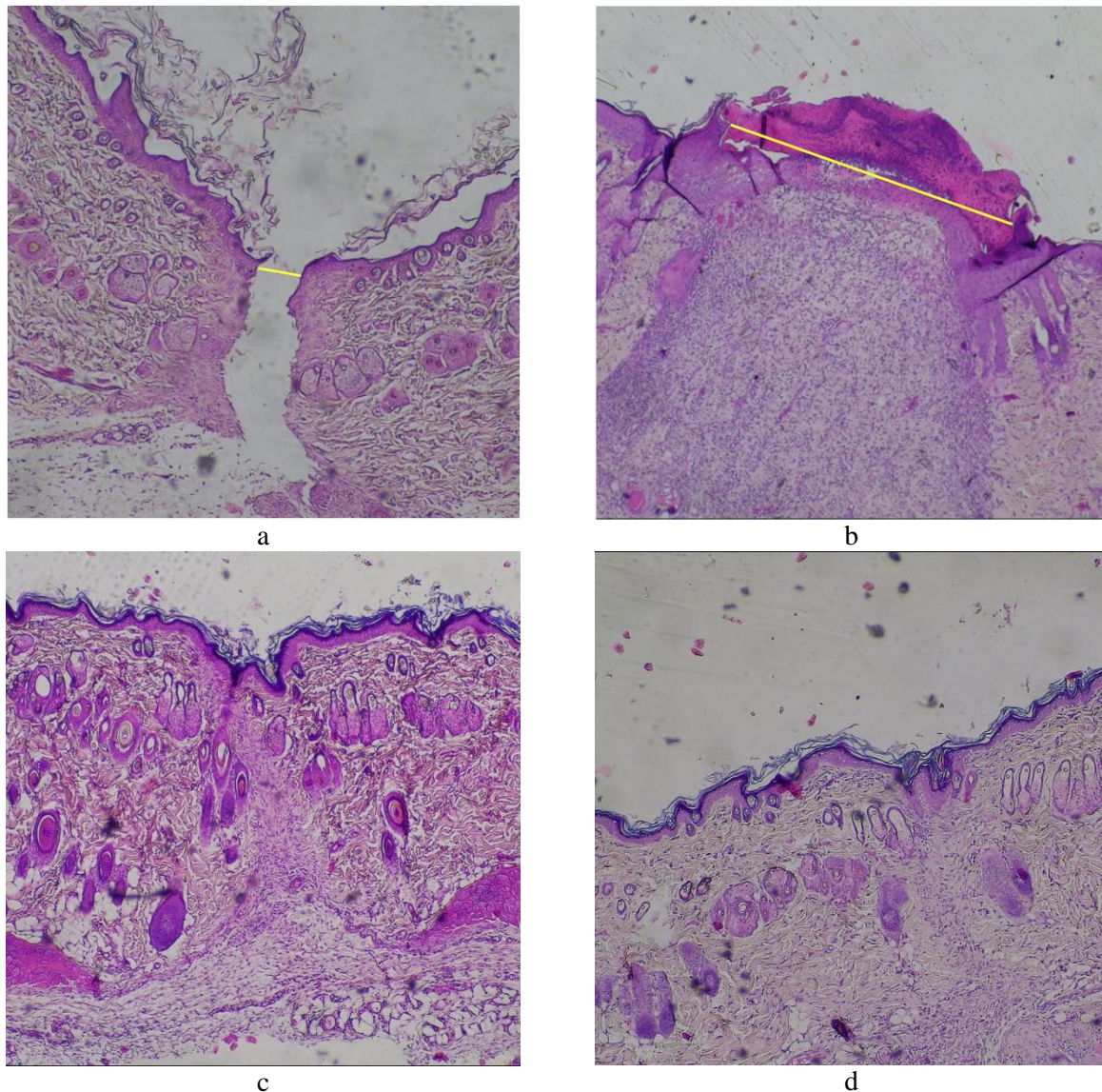
Lebar luka dalam penelitian ini adalah jarak antara jaringan normal yang diukur pada tingkat epidermis yang berisi jaringan luka maupun ruang kosong pada pengamatan mikroskopis (Gambar 2a dan b). Penutupan luka pada model luka insisi hewan coba, khususnya tikus, terjadi dengan bertemunya kedua sisi panjang luka (Gross, *et al.*, 1995). Beberapa spesimen pada hampir setiap kelompok mengalami penutupan (Gambar 2c dan d), sehingga ukuran lebar luka dianggap 0 μm dan tidak dimasukkan dalam penghitungan rerata dengan tujuan meningkatkan objektifitas. Pada pengamatan hari ke-3, seluruh kelompok kontrol belum mengalami penutupan sedangkan satu spesimen dari kelompok perlakuan telah mengalami penutupan luka. Uji Mann-Whitney U *test* pada kelompok perlakuan ($405,75 \pm 110,11$) dan kontrol ($806,20 \pm 644,41$) pengamatan hari ke-3 menunjukkan perbedaan tidak signifikan ($p = 0,413$). Meski demikian terdapat perbedaan rerata lebar luka yang cukup besar, di mana kelompok perlakuan memiliki rerata lebar luka yang lebih kecil.

Pada pengamatan hari ke-5, seluruh sampel dalam kelompok kontrol belum mengalami penutupan, sedangkan pada kelompok perlakuan hanya terdapat satu sampel yang lebar lukanya dapat diukur. Uji statistik tidak dapat dilakukan pada kelompok pengamatan hari ke-5 dan ke-7 karena terdapat banyak jumlah sampel luka yang telah mengalami penutupan.

Tabel 2. Rerata lebar luka pada tiap kelompok

Kelompok	Hari pengamatan	n	Rata-rata lebar luka (μm)	<i>p</i>
Perlakuan	3	4	$405,75 \pm 110,11$	0,41
Kontrol	3	5	$806,20 \pm 644,41$	
Perlakuan	5	1	400	n/a
Kontrol	5	5	$334,40 \pm 233,92$	
Perlakuan	7	0	-	n/a
Kontrol	7	1	16	

Keterangan: n = jumlah luka yang secara mikroskopis belum mengalami penutupan; n/a (*not applicable*) = uji statistik tidak dapat dilakukan sehingga *p* tidak bisa didapatkan.



Gambar 2. Pengukuran lebar luka secara mikroskopis. Garis kuning pada gambar (a) dan (b) menunjukkan jarak yang diukur. Keterangan: (a) jarak yang diukur menyebrangi ruang kosong pada daerah luka, (b) jarak yang diukur melewati jaringan pembekuan darah dan jaringan nekrotik, (c) didapati bentukan depresi pada daerah luka namun sudah tertutup dengan lapisan epidermis, (d) luka yang telah tertutup dan permukaan cenderung rata.

Diskusi

Pada setiap hari pengamatan, kelompok perlakuan dengan ekstrak propolis memiliki paling tidak satu sampel luka yang sudah tidak tampak. Sedangkan pada hari ke-3 dan ke-5, seluruh luka dalam kelompok kontrol masih tampak. Penyembuhan luka yang sempurna didapatkan pada jangka waktu yang pendek, yaitu selama 3 hari hingga 5 hari khususnya pada kelompok perlakuan dengan ekstrak propolis. Penyembuhan luka normal

manusia hingga pada titik lukanya sudah tidak tampak lagi membutuhkan waktu di atas 3 minggu untuk menyelesaikan seluruh fase penyembuhan luka (Gonzalez, *et al.*, 2016). Luka dapat sembuh pada hewan coba tikus dalam jangka waktu yang pendek kemungkinan dapat dijelaskan oleh metabolisme tikus yang lebih cepat daripada manusia (Schiaffino & Reggiani, 2011). Adanya satu sampel yang mengalami penyembuhan sempurna pada kelompok perlakuan, dibandingkan dengan kelompok kontrol,

menandakan adanya peningkatan kesembuhan luka dengan pemberian ekstrak propolis. Ada kemungkinan setiap individu hewan coba memiliki respon yang bervariasi terhadap ekstrak propolis, meskipun homogenitas hewan coba telah dikendalikan, sehingga sangat mungkin luka tiap individu hewan coba sembuh dalam jangka waktu yang bervariasi. Keterbatasan dalam studi ini adalah penampakan luka tidak diamati setiap hari, karena membuka penutup luka akan memaparkan luka pada berbagai gangguan dari lingkungan serta menimbulkan stres pada hewan coba.

Penyembuhan luka terdiri dari tiga fase, yakni fase inflamasi, fase proliferasi, dan fase remodeling (Diegelmann & Evans, 2004; Gonzalez, *et al.*, 2016). Fase inflamasi adalah fase yang bertujuan untuk membersihkan luka dari jaringan nekrotik, benda asing, dan kuman. Secara umum pada manusia fase ini mulai dari saat luka terbentuk hingga hari ke-3. Fase proliferasi terdiri dari pembentukan matriks ekstraselular dan pembuluh darah. Fase ini berlangsung dari hari ke 3 hingga minggu ke-3 setelah pembentukan luka. Fase remodeling adalah fase terakhir yang bertujuan menata matriks ekstraselular pada area luka dan dapat berlangsung hingga lebih dari satu tahun. Tiga fase tersebut tidak berjalan secara terpisah, namun merupakan proses yang saling tumpang tindih (Gonzalez, *et al.*, 2016). Luka kronis adalah luka yang fase penyembuhannya melebihi waktu yang diperkirakan hingga membutuhkan intervensi agar dapat sembuh dengan semestinya (Frykberg & Banks, 2015; Velnar, *et al.*, 2009). Pada penelitian ini kronis atau tidaknya luka belum dapat ditentukan karena belum diteliti secara jelas jangka waktu fase-fase penyembuhan luka pada tikus.

Pengamatan pada hari ke-3, 5, dan 7 bertujuan untuk mewakili ketiga fase penyembuhan luka, namun masih dibutuhkan pengamatan lebih lanjut untuk mengevaluasi kualitas dalam mewakili fase-fase tersebut. Fase-fase penyembuhan luka diperkirakan lebih pendek pada hewan coba tikus. Infeksi mengganggu penyembuhan luka terutama dengan memperpanjang inflamasi (Hampton, 2007). Inflamasi yang memanjang adalah akibat dari pengaktifan persinyalan inflamasi dan kerusakan jaringan, dimana keduanya disebabkan oleh pathogen (Zhao, *et al.*, 2013).

Penutupan luka dipengaruhi beberapa faktor seperti kontraksi luka dan epitelisasi (Gonzalez, *et al.*, 2016). Kontraksi luka adalah proses penarikan

jaringan ke arah tengah luka dengan tujuan memperkecil area luka (Sharpe & Martin, 2013). Posisi anatomi luka menentukan kecenderungan luka menutup dengan mekanisme kontraksi luka atau dengan epitelialisasi, meskipun kedua mekanisme tersebut selalu terjadi pada penyembuhan luka. Luka yang dibuat pada bagian punggung dalam penelitian ini lebih mengandalkan kontraksi luka dibandingkan dengan epitelialisasi (Levinson, 2013), meskipun beberapa luka tampak tertutup oleh lapisan epitel (Gambar 1). Sel myofibroblas yang merupakan hasil diferensiasi dari sel fibroblast merupakan efektor utama dalam proses kontraksi luka (Bin & Wang, 2011). Penelitian sebelumnya menemukan bahwa efek anti inflamasi oleh ekstrak propolis diprakarsai oleh peningkatan *transforming growth factor beta* (TGF- β) (Hozzein, *et al.*, 2015) yang dapat meningkatkan proliferasi sel fibroblast (Chitturi, *et al.*, 2015) yang kemungkinan dapat meningkatkan penutupan luka dengan kontraksi pada penelitian ini.

Lebar luka dalam penelitian ini menggambarkan penutupan luka yang dapat diamati secara mikroskopis. Dalam penelitian ini, penutupan adalah saat jaringan epidermis telah menutup area luka (Gambar 2c dan d). Lebar luka dianggap sebagai jarak yang akan diperkecil oleh mekanisme epitelialisasi atau dengan kontraksi luka, karena pada model luka insisi arah kontraksi luka dan epitelialisasi bergerak ke arah tengah secara transversal pada luka (Gross, *et al.*, 1995; Pastar, *et al.*, 2014). Kontraksi luka pada model luka eksisi ditunjukkan oleh beberapa penelitian (Gross, *et al.*, 1995; Sharpe & Martin, 2013; Yeh, *et al.*, 2017) namun belum banyak penelitian yang menggunakan model luka insisi (Gross, *et al.*, 1995). Penelitian lebih lanjut dibutuhkan untuk membandingkan luka insisi dengan eksisi untuk menentukan kelebihan dan kekurangan masing-masing sebagai model luka pada hewan coba.

Pemberian ekstrak propolis menunjukkan jarak lebar luka yang lebih kecil pada hari ke-3. Dapat diartikan, melalui efeknya yang beragam, propolis meningkatkan penyembuhan luka yang pada penelitian ini ditunjukkan oleh penutupan luka yang lebih cepat pada pengamatan mikroskopis. Pada hari ke-5 pengamatan makroskopis menunjukkan terdapat 4 sampel pada kelompok perlakuan yang masih memiliki luka yang tampak (Tabel 1), namun terlihat pada pengamatan mikroskopis bahwa sebagian luka yang masih tampak tersebut telah mengalami penutupan

(Tabel 2). Kontraksi luka dan epitelialisasi terutama terjadi pada fase proliferasi dan berlangsungnya fase proliferasi sangat dipengaruhi oleh fase inflamasi (Velnar, *et al.*, 2009). Oleh karena itu penutupan luka dapat diartikan sebagai berjalannya fase proliferasi. Fase inflamasi yang memanjang karena infeksi, selain menyebabkan keterlambatan fase proliferasi, dapat menyebabkan timbulnya bekas luka atau *scar* pada akhir penyembuhan luka karena ekspresi sitokin pro-inflamasi yang berlebihan (Landen, *et al.*, 2016). Peningkatan sitokin pro-inflamasi yang juga meliputi interferon gamma (IFN- γ), interleukin 1 (IL-1), interleukin 6 (IL-6) dan *tumor necrosis factor alpha* (TNF- α) menyebabkan lingkungan area luka yang bersifat proteolitik sehingga dapat menghambat mulainya fase proliferasi (Landen, *et al.*, 2016). Propolis diteliti dapat menurunkan konsentrasi IL-6 dan TNF- α yang merupakan sitokin pro-inflamasi, dan di sisi lain meningkatkan TGF- β dan IL-10 yang merupakan sitokin anti-inflamasi (Machado, *et al.*, 2012). Efek anti-inflamasi propolis berperan penting dalam transisi fase inflamasi menuju ke fase proliferasi.

MRSA adalah salah satu bakteri yang paling sering menyebabkan infeksi pada luka operasi (Giacometti, *et al.*, 2000). MRSA merupakan tipe bakteri *Staphylococcus aureus* yang memiliki resistensi terhadap antibiotik methicillin dan dapat ditemukan sebagai flora normal pada tubuh manusia (Nathwani, *et al.*, 2010) sehingga risiko paparan terhadap patogen ini meningkat. Selain memiliki pola resisten yang berbeda, MRSA juga memiliki virulensi yang berbeda dengan *Staphylococcus aureus* (Sina, *et al.*, 2013). Penelitian lain menunjukkan MRSA memiliki kemampuan membentuk biofilm yang dapat meningkatkan persistensi MRSA dalam area luka (Dakheel, *et al.*, 2016). Sifat antibakterial yang dimiliki propolis juga dapat meningkatkan efek penyembuhan luka, karena eradikasi bakteri yang lebih cepat akan mencegah memanjangnya fase inflamasi. Penelitian ini belum mengkaji efek antibakterial propolis terhadap MRSA yang digunakan, namun penelitian-penelitian terdahulu telah membuktikan secara konfiden tentang sifat antibakterial ekstrak propolis (Hamouza, *et al.*, 2018; Wojtyczka, *et al.*, 2013).

Sebagian studi yang mengkaji tentang efek ekstrak propolis sebagai terapi luka di hewan coba

mengaplikasikannya secara topikal (Almeida, *et al.*, 2013; Hozzein, *et al.*, 2015). Pemberian ekstrak propolis secara oral pada penelitian ini menunjukkan kemungkinan bahwa seluruh atau sebagian zat yang terkandung dalam propolis dapat terdistribusi ke dalam area luka. Hal ini ditunjukkan oleh adanya peningkatan penyembuhan luka pada kelompok perlakuan. Farmakodinamik dan farmakokinetik ekstrak propolis, serta zat-zat yang dikandungnya, perlu dipelajari lebih lanjut.

Simpulan

Dari pengamatan makroskopis maupun mikroskopis, pemberian ekstrak propolis per-oral pada model hewan coba dapat meningkatkan kecepatan penyembuhan luka. Penelitian selanjutnya hendaknya mengkaji lebih dalam mekanisme-mekanisme spesifik propolis dalam membantu penyembuhan luka.

Daftar pustaka

- Al-Waili, N. Al-Ghamdi, A. Ansari, M. J. Al-Attal, Y. & Salom, K., 2012. Synergistic effects of honey and propolis toward drug multi-resistant *Staphylococcus Aureus*, *Escherichia coli* and *Candida Albicans* isolates in single and polymicrobial cultures. *International Journal of Medical Sciences*, 9(9): 793–800.
- Almeida, E.B. Cordeiro, J. Karla, A. Lima, D. Oliveira, L. De, Oliveira, S., 2013. The incorporation of Brazilian propolis into collagen-based dressing films improves dermal burn healing. *Journal of Ethnopharmacology*, 147(2): 419–25.
- Bin, L. & Wang, J.H.C., 2011. Fibroblasts and Myofibroblasts in Wound Healing: Force Generation and Measurement. *J Tissue Viability*, 20(4): 108–20.
- Chitturi, R.T. Balasubramaniam, A.M. Parameswar, R.A. Kesavan, G. Haris, K.T.M. Mohideen, K., 2015. The Role of Myofibroblasts in Wound Healing, Contraction and its Clinical Implications in Cleft Palate Repair. *Journal of International Oral Health*, 7: 75–80.
- Dakheel, K.H. Rahim, R.A. Neela, V.K. Al-Obaidi, J.R. Hun, T.G. Yusoff, K., 2016. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Biofilms and Their Influence on Bacterial Adhesion and Cohesion. *BioMed Research International*, 2016.

- Diegelmann, R.F. & Evans, M.C., 2004. Wound healing: an overview of acute, fibrotic and delayed healing. *Frontiers in Bioscience, January*(1): 283–9.
- Frykberg, R.G. & Banks, J., 2015. Challenges in the Treatment of Chronic Wounds. *Advances in Wound Care*, 4(9), 560–82.
- Giacometti, A. Cirioni, O. Schimizzi, A.M. Prete, M.S.D.D'Errico, M.M. Petrelli, E. Scalise, G., 2000. Epidemiology and Microbiology of Surgical Wound Infections Epidemiology and Microbiology of Surgical Wound Infections. *Journal of Clinical Microbiology*, 38(2): 918–22.
- Gonzalez, A.C.D.O. Costa, T.F. Andrade, Z.D.A. Medrado, A.R.A.P., 2016. Wound healing - A literature review. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, 91(5): 614–20.
- Gross, J.Farinelli, W. Sadow, P. Anderson, R. Bruns, R., 1995. On the mechanism of skin wound " contraction ": A granulation tissue " knockout " with a normal phenotype. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92(June): 5982–6.
- Hamouza, M.S. Rahman, M.F.A.E. Hafeez, M.A. Gerges, A., 2018. Egyptian fennel honey and / or propolis against MRSA harboring both mecA & icaA genes. *International Journal of Complementary and Alternative Medicine*, 11(3), 180–5.
- Hampton, S., 2007. Bacteria and wound healing. *Journal of Community Nursing*, 21(10), 32–40.
- Hozzein, W.N. Badr, G. Ghamdi, A.A.A. Sayed, A. Al-Waili, N.S. Garraud, O., 2015. Topical application of propolis enhances cutaneous wound healing by promoting TGF-beta/smad-mediated collagen production in a streptozotocin-induced type I diabetic mouse model. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 37(3): 940–54.
- Järbrink, K. Ni, G. Sönnergren, H. Schmidtchen, A. Pang, C. Bajpai, R.Car, J., 2016. Prevalence and incidence of chronic wounds and related complications : a protocol for a systematic review. *Systematic Reviews*, 5: 152.
- Kuropatnicki, A.K.Szliszka, E.Krol, W., 2013. Historical aspects of propolis research in modern times. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2013.
- Landen, N.X.Li, D. Stable, M., 2016. Transition from inflammation to proliferation : a critical step during wound healing. *Cell. Mol. Life Sci*, 73: 3861–85.
- Levinson, H., 2013. A Paradigm of Fibroblast Activation and Dermal Wound Contraction to Guide the Development of Therapies for Chronic Wounds and Pathologic Scars. *Adv Wound Care (New Rochelle)*, 2(4): 149–59.
- Lotfy, M.Badra, G. Burham, W. Alenzi, F.Q., 2006. Combined use of honey, bee propolis and myrrh in healing a deep, infected wound in a patient with diabetes mellitus. *British Journal of Biomedical Science*, 63(4): 171–3.
- Machado, J.L. Assuncao, A.K.M.Silva, M.C.P.D. Assunc, M. Silva, A. Conceic, G.Berretta, A.A., 2012. Brazilian Green Propolis : Anti-Inflammatory Property by an Immunomodulatory Activity. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2012: 1–10.
- Nathwani, D. Davey, P.G. Marwick, C.A., 2010. MRSA: treating people with infection. *Clinical Evidence*, November: 1–18.
- Ogawa, R., 2017. Keloid and hypertrophic scars are the result of chronic inflammation in the reticular dermis. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(3).
- Pastar, I.Stojadinovic, O.Yin, N.C. Ramirez, H. Nusbaum, A.G. Sawaya, A. Patel, S.B.Khalid, L. Isseroff, R.R.Tomic-Canic, M., 2014. Epithelialization in Wound Healing: A Comprehensive Review. *Advances in Wound Care*, 3(7), 445–64.
- Pillai, S.I. Palsamy, P. Subramanian, S. Kandaswamy, M., 2010. Wound healing properties of Indian propolis studied on excision wound-induced rats. *Pharmaceutical Biology*, 48(11): 1198–206.
- Schiaffino, S. & Reggiani, C., 2011. Fiber types in mammalian skeletal muscles. *Physiol Rev*, 91: 1447–1531.
- Schindelin, J. Arganda-Carreras, I. Frise, E.Kaynig, V. Longair, M. Pietzsch, T. Preibisch, S.Rueden, C. Saalfeld, S.Schmid, B. Tinevez, J. White, D.J.Hartenstein, V.Eliceiri, K. Tomancak, P. Cardona, A. 2012. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature Methods*, 9(7): 676–682.
- Sharpe, J.R. & Martin, Y., 2013. Strategies Demonstrating Efficacy in Reducing Wound Contraction In Vivo. *Advances in Wound Care*, 2(4): 167–175.

- Sina, H. Ahoyo, T.A. Moussaoui, W.Keller, D. Bankolé, H.S. Barogui, Y. Stienstra, Y.Kotchoni, S.O. Baba-Moussa, L., 2013. Variability of antibiotic susceptibility and toxin production of *Staphylococcus aureus* strains isolated from skin, soft tissue, and bone related infections. *BMC Microbiology*, 13(1).
- Siqueira, M.F. Li, J. Cheha, L. Desta, T. Chino, T., 2010. Impaired wound healing in mouse models of diabetes is mediated by TNF- α dysregulation and associated with enhanced activation of Forkhead boxO1 (FOXO1). *Diabetologia*, 53: 378–388.
- Toreti, V.C.Sato, H.H. Pastore, G.M. Park, Y.K., 2013. Recent progress of propolis for its biological and chemical compositions and its botanical origin. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2013.
- Valente, M.J. Baltazar, A.F. Henrique, R. Estevinho, L.Carvalho, M., 2011. Biological activities of Portuguese propolis: Protection against free radical-induced erythrocyte damage and inhibition of human renal cancer cell growth in vitro. *Food and Chemical Toxicology*, 49(1): 86–92.
- Velnar, T. Bailey, T. Smrkolj, V., 2009. The Wound Healing Process : an Overview of the Cellular and Molecular Mechanisms. *The Journal of International Medical Research*, 37(5): 1528–42.
- Wagh, V.D., 2013. Propolis: A wonder bees product and its pharmacological potentials. *Advances in Pharmacological Sciences*, 2013.
- Wojtyczka, R.D. Kępa, M. Idzik, D.Kubina, R. Kabała-Dzik, A.Dziedzic, A.Wąsik, T.J., 2013. In vitro antimicrobial activity of ethanolic extract of polish propolis against biofilm forming *staphylococcus epidermidis* strains. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2013.
- Yeh, C. Chen, C. Leu, Y. Lin, M. Chiu, M. Wang, H., 2017. The effects of artocarpin on wound healing: in vitro and in vivo studies. *Scientific Reports*, 7(15599): 1–13.
- Zhao, G. Usui, M.L. Lippman, S.I. James, G.A. Stewart, P.S. Fleckman, P. Olerud, J.E., 2013. Biofilms and Inflammation in Chronic Wounds. *Advances in Wound Care*, 2(7): 389–399.