

Pengaruh Penggunaan Kitosan Dengan Berat Molekul Yang Berbeda Terhadap Ekspresi Tumor Necrosis Factor Alpha (Tnf A) Pada Penyembuhan Luka Pencabutan Gigi Tikus *Rattus Norvegicus*

Sularsih¹, Soeprijanto²

¹Laboratorium Biomaterial Kedokteran Gigi

²Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Hang Tuah

Abstrak

Latar belakang: Kitosan yang memiliki kandungan *glucosamine* dan *acetlyglucosamine* terbukti memiliki sifat biologis yang baik, *biodegradable* dan *biofungsional*. *Tumor necrosis factor alpha (TNF α)* merupakan indikator inflamasi yang memiliki peran penting pada proses penyembuhan luka pencabutan gigi. **Tujuan penelitian:** Tujuan penelitian ini adalah membandingkan ekspresi *TNF α* pada proses penyembuhan luka pencabutan gigi dengan menggunakan kitosan gel yang memiliki berat molekul yang berbeda.

Metode: *Rattus norvegicus* strain wistar, jantan, umur 8-16 minggu, dibagi menjadi 3 kelompok perlakuan yaitu kelompok I dengan perlakuan kitosan gel yang memiliki berat molekul yang tinggi, kelompok II dengan perlakuan kitosan gel yang memiliki berat molekul yang rendah dan kelompok III tanpa pemberian kitosan gel. Kitosan diaplikasikan pada soket gigi. Rahang mandibula didekaputasi pada 3 dan 4 hari setelah perlakuan kemudian dilakukan pemeriksaan histopatologi anatomi untuk mengamati proses angiogenesis. Data dianalisa menggunakan menggunakan One way Anova test.

Hasil: Menunjukkan bahwa ada perbedaan yang significant antara kelompok perlakuan dengan berat molekul yang tinggi dan rendah ($p < 0,05$). Ekspresi *TNF α* pada kelompok perlakuan berat molekul yang tinggi dan rendah pada pengamatan 3 hari adalah $11,83 \pm 2,137$ and $9,60 \pm 0,894$. Pada pengamatan 4 hari adalah $17,00 \pm 1,871$ and $12,17 \pm 1,722$.

Kesimpulan: Aplikasi kitosan gel dengan berat molekul yang tinggi dapat menstimulasi ekspresi *TNF α*.

Keys words: Kitosan. Tumor Necrotizing Factor Alpha, penyembuhan luka

Korespondensi:

Sularsih

Departemen Ilmu Material
Kedokteran Gigi, Fakultas
Kedokteran Gigi Universitas Hang
Tuah. Jl. Arif Rachman Hakim
150 Surabaya 60111. E-mail:
larsihdentist@gmail.com

The Effect of Using chitosan with different molecular weight to The Expression of Tumor Necrosis Factor Alpha on wound healing process of dental extraction of Rattus Norvegicus

Abstract

Background: Chitosan which is composed glucosamine and acetlyglucosamine has been proven to be biologically, renewable, biodegradable, biocompatible and biofunctional. Tumor necrosis factor alpha (TNF α) is inflammatory factors that have important role in wound healing process of dental extraction. **Purpose:** The aim of this study was to compare the expression of Tumor Necrotating Factor Alpha (TNF α) on wound healing process of dental extraction using different molecular weight of chitosan gel. **Methods:** Rattus norvegicus strain wistar male, aged 8-16 weeks, divided into 3 treatment groups namely group 1 which given chitosan gel with high molecular weight. Group II which given chitosan with low molecular weight and group III which given't chitosan gel. Chitosan gel were applied into the socket of dental extraction. Rat was decapitated 3 and 4 days after chitosan application and the jaw in the treated regions and control group were cut for imunohistochemical examination to observe the expression of Tumor Necrotating Factor Alpha (TNF α). Data were analyzed using One way Anova test. **Results:** The result showed significant differences of expression of Tumor Necrotating Factor Alpha (TNF α) between groups with different molecular weight ($p < 0,05$). The expression of TNF using chitosan with high and low molecular weight were $11,83 \pm 2,137$ and $9,60 \pm 0,894$ on 3 days examination and $17,00 \pm 1,871$ and $12,17 \pm 1,722$ on 4 days examination. **Conclusion:** The application of Chitosan gel with high molecular weight on wound healing process of dental extraction could stimulate the expression of TNF α .

Keys words: Chitosan. Tumor Necrotating Factor Alpha, wound healing

Pendahuluan

Pada proses penyembuhan luka pencabutan gigi akan terjadi proses epitelisasi pada soket gigi, pembentukan jaringan ikat baru dan remodeling tulang alveolaris. Proses penyembuhan luka pencabutan gigi pada prinsipnya dibagi menjadi tiga tahap yaitu

inflamasi, proliferasi dan remodeling. Tahap inflamasi dimulai sejak terjadinya luka hingga hari kelima. Proses inflamasi terjadi setelah pembentukan bekuan darah. Proses pembentukan bekuan darah terjadi segera setelah pencabutan gigi, secara klinis tampak darah mengisi soket dan menggumpal. Sel darah merah dapat terlihat diantara serat

fibrin, proses ini berlanjut menuju ke tengah soket, disini terlihat susunan sel darah merah dan membentuk pola geometrik kecil yaitu bentukan tulang baru. Permukaan bekuan darah tertutupi anyaman fibrin yang mengandung sel leukosit, PMN, sisa makanan dan bakteri. Sel radang yaitu sel PMN, sel makrofag dan sel neutrofil akan bermigrasi ke arah soket gigi.¹ Sel makrofag akan muncul 48-96 jam setelah terjadi luka. Sel makrofag akan berumur lebih panjang dibanding sel PMN dan akan tetap ada di dalam luka sampai penyembuhan luka telah berjalan sempurna.² Sel makrofag akan melepaskan sitokin berupa *Tumor necrosis factor alpha* (TNF- α), *Transforming growth factor beta* (TGF- β), *Interleukin 6* (IL-6), *Interleukin 8* (IL-8), proteinase yaitu diantaranya adalah enzim kolagenase *Matriks metalloproteinase* (MMPs) dan mediator lain seperti prostaglandin E2 (PGE2).^{1,3}

Proses inflamasi yang terjadi pada proses penyembuhan luka sangat penting. Adanya proses inflamasi memungkinkan penambahan molekul sel efektor ke lokasi infeksi untuk meningkatkan fungsi sel makrofag, menyediakan suatu hambatan untuk mencegah penyebaran infeksi dan mendukung proses perbaikan jaringan yang rusak. Pada respon inflamasi pelepasan sitokin yang cepat terjadi di tempat infeksi. Salah satu yang paling awal sitokin yang dihasilkan adalah tumor necrosis factor alpha (TNF- α), yang disintesis oleh monosit dan makrofag teraktivasi.^{1,2} Sitokin ini mengubah kapiler di dekatnya sehingga sirkulasi sel darah putih dapat dengan mudah ke tempat infeksi. TNF- α juga dapat mengikat reseptor pada sel yang terinfeksi dan merangsang respon anti virus. Dalam hitungan detik serangkaian sinyal mulai ada yang menyebabkan kematian sel sebagai usaha untuk mencegah penyebaran infeksi. Hal ini sangat berpengaruh penting terhadap percepatan penyembuhan.^{1,5}

Berbagai metode dikembangkan dalam penanganan luka untuk menghasilkan penyembuhan luka yang optimal, salah satunya adalah pendekatan penyembuhan luka pencabutan gigi menggunakan

biomaterial dari laut yaitu kitosan. Kitosan merupakan biomaterial yang telah teruji dapat menunjang proses penyembuhan luka.⁶ Kitosan merupakan biopolimer karbohidrat alami hasil dari deasetilasi dari chitin, komponen utama dari cangkang *Crustacea sp.* seperti kepiting, udang, dan *crawfish* yang banyak didapat dari limbah *seafood*. Kitosan adalah kopolimer dari *N-asetil-glukosamin* dan *N-glukosamin* dan telah banyak diteliti dalam berbagai aplikasi biomedis seperti penyembuhan luka, *drug delivery system*, *ophthalmology*, *implant coatings* dan *tissue engineering* atau regenerasi karena memiliki sifat biokompatibilitas, biodegradabilitas, tidak toksik, merupakan produk degradasi yang *nonacidic*, mudah dimanipulasi secara kimia maupun fisik, dan kemampuannya dalam mempercepat proses penyembuhan luka.^{6,7}

Faktor utama dalam mempercepat proses penyembuhan luka dapat dihubungkan dengan adanya *N-acetyl-D-glucosamine*. Selain itu penyembuhan luka tidak hanya bergantung pada jumlah *N-acetyl-D-glucosamine*, tetapi lebih bergantung pada struktur molekulnya dari bahan tersebut.⁸ Berdasarkan latar belakang di atas, mengingat pentingnya peran sitokin pro inflamasi yaitu tumor necrosis factor alpha (TNF- α) pada proses penyembuhan luka, peneliti akan mengembangkan penelitian yaitu tentang perbedaan pengaruh penggunaan kitosan dengan berat molekul tinggi dan rendah terhadap ekspresi tumor necrosis factor alpha (TNF- α) pada penyembuhan luka pencabutan gigi.

Metode

Penelitian ini termasuk penelitian laboratorium (*Experimental Research*) atau penelitian *experimental*, dengan menggunakan rancangan penelitian *True Experimental Design - Post Test Only Control Group Design*. Hewan coba yang dipergunakan pada penelitian ini ialah tikus wistar putih (*Rattus Novergicus Strain Wistar*). Besar sampel penelitian ini adalah 48 ekor tikus wistar yang terbagi dalam 6 kelompok yaitu

kelompok kontrol dan kelompok perlakuan dengan lama pengamatan 3 dan 4 hari. Masing- masing kelompok terdiri dari 8 ekor tikus wistar. Kelompok perlakuan terdiri dari kelompok perlakuan dengan sediaan kitosan yang memiliki berat molekul tinggi, kelompok perlakuan dengan sediaan kitosan yang memiliki berat molekul yang rendah.

Serbuk kitosan yang digunakan dengan merk SIGMA-ALDRICH yang memiliki berat molekul yang tinggi (Product number= 419419, Lot number= MKBH5816V) dan kitosan dengan berat molekul yang rendah (Product number= 448869, Lot number= MKBH7256V). Serbuk kitosan yang digunakan memiliki besar derajat deasetilasi lebih dari 85 %. Kitosan gel 1% (w/p) dibuat dengan melarutkan 1 gram bubuk kitosan dalam 100 ml asam asetat 2% sesuai dengan aturan pabrik sehingga menjadi sediaan bentuk gel yang kemudian dinetralkan dengan larutan NaOH sehingga menjadi sediaan kitosan gel 1 % yang memiliki pH yang netral.

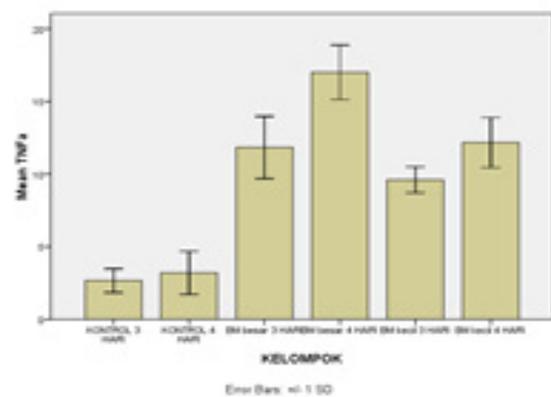
Kitosan gel dengan konsentrasi 1% (w/v) dimasukkan di soket tempat luka bekas pencabutan gigi *Incisive* rahang bawah menggunakan *syringe* dengan ujung yang berdiameter kecil, kemudian dilanjutkan menjahit lukanya dengan *non resorbable sutures*. Tikus perlakuan dan tikus kontrol didekaputasi pada hari ke 3 dan 4 setelah pemberian perlakuan.

Tulang rahang di daerah interdental gigi *Incisive* rahang bawah dipotong dan dimasukkan dalam larutan fiksasi menggunakan *buffer formalin* 10%. Dilakukan proses dekalsifikasi dengan EDTA selama kurang lebih 3 minggu kemudian dilakukan proses dehidrasi dengan

larutan alkohol, *clearing* dengan larutan *xylene*, infiltrasi dengan cairan parafin dan *embedding* dalam blok parafin. Tahapan terakhir adalah pemotongan yang dilakukan dengan *rotary microtome* secara serial dengan ketebalan 4 μ m. Sayatan jaringan ditempelkan pada gelas objek yang siap untuk dilakukan pemeriksaan Imunohistokimia dengan *Kromogen DAB Monoclonal Anti Antibody Tumor Necrosis Factor Alpha Rat*. Pengamatan ekspresi TNF- α dilakukan pada sepertiga bagian apikal gigi yang berbatasan dengan tulang alveolaris.

Hasil

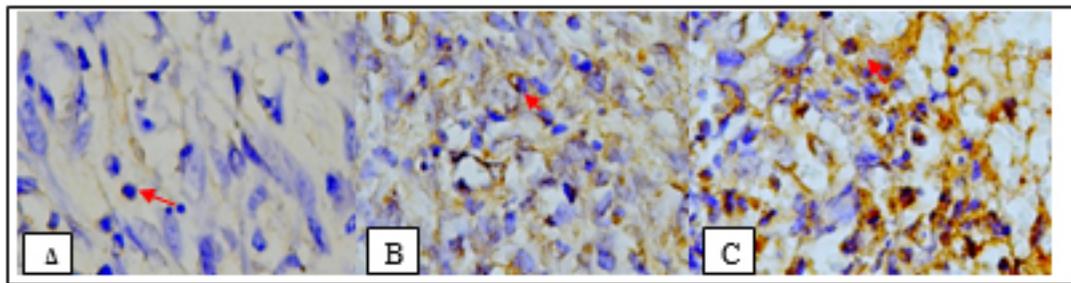
Rerata dan simpang baku Ekspresi Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF- α) pada setiap kelompok kitosan dengan berat molekul tinggi, kelompok kitosan dengan berat molekul rendah dan kelompok kontrol lama pengamatan 3 dan 4 hari dapat dilihat pada tabel 1, gambar grafik 1 dan gambar 2.



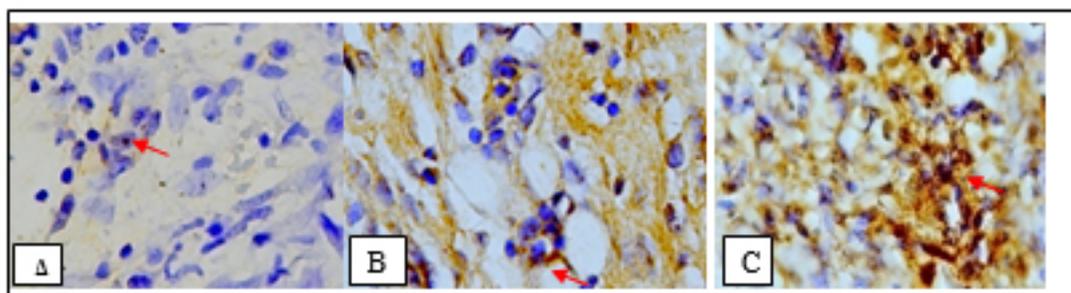
Gambar 1. Grafik jumlah jumlah Ekspresi TNF- α pada kelompok perlakuan dengan berat molekul tinggi pada pengamatan 3 dan 4 hari

Tabel 1. Rerata dan simpang baku ekspresi TNF- α pada setiap kelompok kitosan dengan berat molekul tinggi, kelompok kitosan dengan berat molekul rendah dan kelompok kontrol pada lama pengamatan 3 dan 4 hari

| Variabel | Perlakuan | Lama pengamatan | |
|------------------------|----------------------|-----------------|-------------|
| | | 3 hari | 4 hari |
| Ekspresi TNF- α | Berat molekul tinggi | 11,83±2,137 | 17,00±1,871 |
| | Berat molekul rendah | 9,60±0,894 | 12,17±1,722 |
| | Kontrol | 2,67±0,816 | 3,20±1,483 |



Gambar 2. Gambaran imunohistokimia Ekspresi TNF- α pada pengamatan 3 hari (A) Jumlah Ekspresi TNF- α pada kelompok kontrol (B) Jumlah Ekspresi TNF- α pada kelompok perlakuan berat molekul rendah (C) Jumlah Ekspresi TNF- α pada kelompok perlakuan berat molekul tinggi



Gambar 3. Gambaran imunohistokimia Ekspresi TNF- α pada pengamatan 4 hari (A) Jumlah Ekspresi TNF- α pada kelompok kontrol (B) Jumlah Ekspresi TNF- α pada kelompok perlakuan berat molekul rendah

Berdasarkan tabel 1 menunjukkan jumlah Ekspresi TNF- α pada kelompok perlakuan dengan berat molekul tinggi pada pengamatan 3 dan 4 hari hari lebih banyak dibandingkan dengan kelompok kontrol serta kelompok perlakuan dengan berat molekul rendah.

Berdasarkan gambar 1,2 dan 3 jumlah Ekspresi TNF- α pada kelompok perlakuan dengan berat molekul tinggi pada pengamatan 3 dan 4 hari hari lebih banyak dibandingkan dengan kelompok kontrol serta kelompok perlakuan dengan berat molekul rendah. Rerata dan simpang baku jumlah pembuluh darah yang didapat dianalisa dengan uji statistik *Kolmogorov Smirnov* menunjukkan bahwa semua data berdistribusi normal ($p > 0,05$), sehingga memenuhi persyaratan menggunakan uji parametrik. Uji *Levene* menunjukkan nilai 0,253, probabilitas $> 0,05$, maka asumsi homogen terpenuhi, sehingga memenuhi persyaratan menggunakan uji parametrik.

Hasil uji t test perbandingan antara kitosan dengan berat molekul tinggi dan rendah pada lama pengamatan 3 dan 4 hari setelah perlakuan menunjukkan jumlah Ekspresi TNF- α terdapat perbedaan yang bermakna ($p < 0,05$) dengan harga p sebesar 0,000. Hasil uji One way Anova menunjukkan perbandingan antara kelompok perlakuan menunjukkan jumlah Ekspresi TNF- α terdapat perbedaan yang bermakna ($p < 0,05$) dengan harga p sebesar 0,000

Pembahasan

Penyembuhan luka merupakan salah satu mekanisme yang melibatkan perbaikan dan regenerasi jaringan.⁹ Faktor sistemik yang berpengaruh pada penyembuhan luka antara lain: umur, nutrisi dan faktor hormonal. Penyakit sistemik seperti kardiovaskuler, diabetes melitus, hipertensi dan gangguan perdarahan dapat menyebabkan penyembuhan luka pencabutan gigi menjadi

lebih lama. Pada pasien dengan pemakaian obat hormon *Adrenocorticotropic hormone* (ACTH) dan kortisol dapat menghambat proliferasi sel fibroblas baru dan pembuluh kapiler baru serta reaksi inflamasi sehingga menyebabkan penyembuhan luka terganggu dan menjadi lebih lama.¹⁰

Penderita diabetes melitus juga memiliki masalah dalam penyembuhan luka karena faktor vaskuler, berkurang fungsi dari sel radang, kehilangan sensasi dan perubahan pada metabolisme matrik ekstraseluler. Dengan beberapa keadaan sistemik di atas maka diperlukan percepatan proses penyembuhan luka pencabutan gigi sebagai salah satu upaya untuk mengurangi komplikasi yang ada.^{10,11}

Pada penelitian ini menggunakan bahan kitosan gel yang merupakan salah satu upaya untuk mempercepat proses penyembuhan luka pencabutan gigi. Pada Penelitian ini dihasilkan bahwa ada perbedaan jumlah Ekspresi TNF- α antara penggunaan kitosan gel dengan berat molekul tinggi dan rendah dalam penyembuhan luka pencabutan gigi *Rattus Norvegicus* pada lama pengamatan 3 dan 4 hari. Pada kelompok kontrol yaitu kelompok dengan pencabutan gigi yang tidak diberi aplikasi kitosan gel, menunjukkan jumlah ekspresi TNF- α yang lebih sedikit dibandingkan dengan kelompok perlakuan menggunakan kitosan gel baik berat molekul yang tinggi maupun rendah. Pada proses penyembuhan luka akan terjadi proses epitelisasi pada soket gigi, pembentukan jaringan ikat baru dan remodeling tulang alveolaris. Proses penyembuhan luka pencabutan gigi pada prinsipnya dibagi menjadi tiga tahap yaitu inflamasi, proliferasi dan remodeling.¹ Tahap inflamasi dimulai sejak terjadinya luka hingga hari kelima.

Sel radang yaitu sel PMN, sel makrofag dan sel neutrofil akan bermigrasi ke arah soket gigi. Sel makrofag akan melepaskan sitokin berupa *Tumor necrosis factor α* (TNF- α), *Transforming growth factor beta* (TGF- β), *Interleukin 6* (IL-6), *Interleukin 8* (IL-8), proteinase yaitu diantaranya adalah enzim kolagenase *Matriks metalloproteinase* (MMPs) dan mediator lain seperti

prostaglandin E2 (PGE2).³ Pada proses inflamasi, sel inflamasi akan melepaskan enzim lisozim. Kitosan akan terbiodegradasi oleh enzim lisozim yang akan memecah *N-acetyl-D-glucosamine* bentuk polimer menjadi *N-acetyl-D-glucosamine* bentuk dimeryang aktif yang selanjutnya membentuk *cross-linked* dengan *glycosaminoglycan* dan *glycoprotein* yang merupakan makromolekul matrik ekstraseluler serta menstimulasi TNF- α , TGF- β 1 dan FGF 2.^{1,12} Tumor necrosis factor alpha (TNF- α) merupakan sitokin yang mengatur aktivasi, diferensiasi, dan proliferasi sel inflamasi dan juga membantu mengatur kelangsungan hidup sel. TNF- α bertindak sebagai kunci dalam respon imun lokal inflamasi. TNF- α adalah protein fase akut yang memulai kaskade sitokin dan meningkatkan permeabilitas pembuluh darah, sehingga merekrut makrofag dan neutrofil ke tempat infeksi.^{13,16} Sel inflamasi yang bermigrasi ke arah luka didominasi oleh sel mononuklear seperti sel makrofag. Pemberian kitosan akan memicu sel makrofag untuk meningkatkan produksi sitokin lainnya yang berupa TGF- β . Kitosan yang diaplikasikan pada luka pencabutan gigi dapat menstimulasi peningkatan TGF β 1 dan FGFs. *Growth factors* ini akan memicu proliferasi fibroblas sehingga penggunaan kitosan dapat meningkatkan jumlah fibroblas pada penyembuhan luka pencabutan gigi.^{12,14}

Pada penelitian ini kitosan dengan perlakuan menggunakan kitosan gel dari berat molekul yang tinggi menunjukkan jumlah ekspresi TNF- α yang lebih besar dibandingkan dengan kelompok perlakuan dengan kitosan yang memiliki berat molekul yang rendah baik pada pengamatan 3 dan 4 hari. Kitosan dapat menstimulasi migrasi dari sel makrofag. Pada kitosan dengan berat molekul yang tinggi mengandung N-asetil yang lebih banyak sehingga akan menstimulasi sel makrofag untuk melepas sitokin TNF- α lebih banyak. Kitosan yang memiliki berat molekul yang tinggi memiliki rantai polimer yang panjang sehingga ikatan molekul semakin kuat. Semakin banyak monomer N-asetil, makin tinggi efek percepatan penyembuhan luka.¹⁵ Kitosan

yang bermuatan positif akan bereaksi dengan permukaan muatan negatif dari *anionic polymer* sehingga mampu memfasilitasi migrasi sel inflamasi, sehingga sel radang meningkat. Sel limfosit dan sel makrofag berinteraksi secara dua arah. Makrofag memproduksi sitokin seperti Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF- α), IL-12, IL-6, dan IL-23, mengenalkan antigen kepada limfosit T, sehingga menimbulkan respon dari limfosit.^{1,16} Limfosit T yang teraktivasi akan memproduksi limfokin yang mengaktifkan lebih banyak monosit dan makrofag berupa *macrophage aggregating factor* (MAF) / IFN- γ dan *macrophage chemotactic factor* (MCF).^{17,18} Limfosit selanjutnya menghasilkan sitokin IL-2 dan *fibroblast activating factor* yang mempengaruhi sel fibroblast sehingga menunjang tahap penyembuhan luka berikutnya.¹⁹ Kitosan dengan berat molekul yang tinggi berikatan dengan reseptor utama pada makrofag untuk kitosan yaitu *mannose receptor*. Setelah berikatan dengan reseptor, kitosan di internalisasi oleh sel makrofag. Kitosan tersebut akan terbiodegradasi oleh enzim lisosim yang akan memecah *N-acetyl-D-glucosamine* bentuk *polimer* menjadi *N-acetyl-D-glucosamine* bentuk *dimer* yang aktif yang selanjutnya membentuk *cross-linked* dengan *glycosaminoglycan* dan *glycoprotein* yang merupakan makromolekul matrik ekstraseluler serta menstimulasi TNF- α .¹⁴ Kitosan yang memiliki berat molekul yang tinggi memiliki viskositas yang tinggi sehingga sifat mukoadesif ke jaringan baik dan absorpsi ke jaringan semakin baik.²⁰ TNF- α merupakan pedang bermata dua, setelah meningkatnya ekspresi TNF- α pada tahap inflamasi diharapkan proses penyembuhan luka selanjutnya yaitu tahap proliferasi segera berlangsung dan terjadi percepatan penyembuhan luka. Penggunaan kitosan dengan berat molekul yang tinggi memungkinkan untuk mempercepat proses penyembuhan luka pencabutan gigi.

Referensi

1. Topazian RG, Goldberg MH, Hupp JR, 2002. Oral and maxillofacial infections

4^{ed}. United States of America: Elsevier Saunders. pp. 2-15

2. Prabakti Y, 2005. Perbedaan Jumlah Fibroblas di Sekitar Luka Insisi pada Tikus yang Diberi Levobupivakain dan yang Tidak Diberi Levobupivakain. Tesis, Universitas Diponegoro Semarang, Indonesia, p. 20-24. Available from http://eprints.undip.ac.id/17651/1/Yudhi_Prabakti.pdf. Accessed Mei 22, 2013
3. Wang G, 2006. Dual effects of soluble chitosan on inflammatory proteins expression and matrix metalloproteinases expression. Dissertation submitted to the department of chemical and biomedical engineering, Taiwan University. pp. 5-45
4. Indonesia medicine, 2012, Imunologi dasar dan respon inflamasi, available: <http://allergycliniconline.com/2012/02/03/imunologi-dasar-radang-dan-respon-inflamasi/>, diakses 16 maret 2014
5. Budihargono O, Yulianti A, dan Rianti D, 2013. Peningkatan Mobilisasi Sel Polimorfonuklear Setelah Pemberian Gel Kitosan 1% pada Luka Pencabutan Gigi Cavia Cobaya. Material Dental Journal Universitas Airlangga 2013 January: 1-6.
6. Kim F .2004 .Physicochemical and Functional Properties of Crawfish Chitosan as Affected by Different Processing Protocols. Thesis, Louisiana State University. h 6-7.
7. Society For Biomaterials, 2009. Biomaterials of the months. Available from <http://www.biomaterials.org/week/bio32.cfm>. Accessed August 13, 2012
8. Chou C, 2003. *Chitosan inhibits prostaglandin E2 formation and cyclooxygenase-2 induction in lipopolysaccharide-treated RAW 264,7 macrophages*. <http://www.sciencedirect.com/science?ob=ArticleUR>, Retrieved 25 october 2010.
9. Chandra. S. 2004. Repair and regeneration of dental tissues textbook of dental and oral histology with embryology. Jaypee Brothers medical publisher (P) LTD, pp 300 – 301, 306 – 309

10. Florman M, 2004. Etiology, prevention and management of post-extraction complications, Available from http://www.whittieroralsurgery.com/media/publications/Post-extraction_Complication_Course.pdf. Accessed August 14, 2012
11. Pedlar J. 2001. *Oral and Maxillofacial Surgery: An Objective-Based Textbook*. Churchill Livingstone.
12. Chin L, Halim AS, 2009. In vitro models in biocompatibility assessment for biomedical-grade chitosan [derivatives in wound management. *J. Molecular Science*. Vol 10. No 3. pp. 1300-1313
13. Le A, Shetty V, 2010. *Oral and maxillofacial surgery*, West Sussex: Wiley-Blackwell Publishing Ltd., pp 166, 168
14. Ueno H, Nakamura F, Mukarami M, Okumura M, Kadosawa T, Fujinaga T, 2001. Evaluation effects of chitosan for the extracellular matrix production by fibroblasts and growth factors production by macrophages. *J. Biomaterials*. Vol 22. pp. 2125-2130.
15. Alsarra IA, 2009. Chitosan Topical Gel Formulation in the Management of Burn Wounds. *International Journal of Biological Macromolecules* 2009; Vol 45: 16-21.
16. Kumar V, Abbas AK, dan Aster JC. 2011. *Robbins Basic Pathology*. 9th Ed. Philadelphia: Elsevier Saunders, p 29-72
17. Mitchell RN, Kumar V, Abbas AK, Fausto N. 2006. *Buku Saku Dasar Patologis Penyakit Robbins & Cotran, Ed. 7*. Jakarta: EGC. h57.
18. Djamaluddin AM, 2009. Pemanfaatan KITOSAN dari Limbah Krustasea untuk Penyembuhan Luka pada Mencit (*Mus musculus albinus*). Skripsi. Institut Pertanian Bogor, Bogor. h8.
19. Suryadi IA, Asmarajaya AAGN, Maliawan S, 2013. Proses Penyembuhan dan Penanganan Luka. Bagian/SMF Ilmu Penyakit Bedah Fakultas Kedokteran Universitas Udayana/Rumah Sakit Umum Pusat Sanglah Denpasar. Available link: <http://ojs.unud.ac.id/index.php/eum/article/download/4885/3671>. Accessed Juni 26, 2013.
20. Sularsih, 2013. The effect of viscosity Chitosan gel to the Application Wound healing Process. *Jurnal Material kedokteran gigi* vol 2 no 1, JMKG 2013 2 (1): 60-67