

ANALISAGELKOMBINASIPLATELETRICHPLASMADAN CHITOSAN TERHADAP PENINGKATAN JUMLAH OSTEOLAS SEBAGAI BONE REGENERATION PADA LUKA PASCA EKSTRAKSI GIGI TIKUS WISTAR

Intan Maryani*, Yayun Siti Rochmah**, Anang Dwi Parmana***

Keywords:

PRP, Chitosan, Bone Regeneration, Wound Healing

ABSTRACT

Background: Extraction has been known as a method for removing the tooth from its socket. Although extraction is frequent, the incidence of post extraction complication are commonly found, about 2,6-30,9%. Complications can inhibit wound healing and bone regeneration of socket. PRP is Platelet Rich Plasma containing growth factors that plays an important role in wound healing, induces bone regeneration and stimulates osteoprogenitor cell into osteoblast cell. Chitosan is a chitin derivate that extracted from the crab shells through deacetylation stage. Chitosan properties are osteoinductive, biocompatible, biodegradable, cell proliferation, antimicrobial, antioxidant, antitumor, and stimulates growth factors capabilities. Purpose: To analyze the combination of PRP and Chitosan gel to increase the number of osteoblast in post extraction wound of wistar rat teeth.

Method: True experimental post-test only control group design was done in 28 wistar rats. Sample were divided into 4 groups: PRP gel, combination PRP and Chitosan gel, Chitosan gel and control group Povidone Iodine. Dextra Mandible incisors were extracted and treated accordingly. Number of osteoblast in post extraction socket was observed microscopically after 14 days using IHC staining. Data analyzed by using One Way ANOVA parametric test followed by Post Hoc LSD test.

Results: There were statically significant difference between number of osteoblast in combination PRP and Chitosan gel group compare to PRP gel group ($p=0,736$), Chitosan gel group ($p=0,402$) and Povidone Iodine group ($p=0,613$).

Conclusion: Combination PRP and Chitosan gel has a good effect in increasing number of osteoblast in wound healing post dental extraction

PENDAHULUAN

Terdapat 4,60% penduduk Indonesia memiliki kasus kerusakan gigi 2,90% kasus dilakukan tindakan ekstraksi¹. Ekstraksi atau pencabutan gigi merupakan suatu aktivitas memisahkan gigi dengan jaringan lunak yang mengelilinginya dan mengeluarkan gigi yang tidak dapat dipertahankan lagi dari soketnya menggunakan *forceps* atau *elevator*². Meskipun tindakan ekstraksi sering dilakukan, namun 2,60-30,9% insidensi komplikasi pasca ekstraksi masih sering terjadi³.

Komplikasi pasca ekstraksi yang terjadi dapat memperlambat penyembuhan luka dan menginduksi terjadinya resorpsi tulang. Terhambatnya proses penyembuhan luka dan regenerasi tulang pada soket menyebabkan regenerasi tulang tidak optimal sehingga dapat terbentuk defek cekung pada *alveolar ridge* yang berdampak terhadap integritas *alveolar ridge*⁴. Perawatan yang sering dilakukan untuk mengoptimalkan proses penyembuhan luka dan regenerasi tulang untuk menjaga integritas *alveolar ridge* setelah ekstraksi dilakukan penambahan material *clot stabilization* dan

*Program Pendidikan Dokter Gigi Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Islam Sultan Agung, **Departemen Bedah Mulut Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Islam Sultan Agung, ***Staf Pengajar Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Islam Sultan Agung

Korespondensi: Intanmaryani9@gmail.com

grafting pada soket alveolar⁵. Penelitian saat ini mengembangkan *biodegradable polymers* sebagai bahan medikamen pada penanganan penyembuhan luka serta bahan *grafting* pada *tissue engineering*, seperti *chitosan*⁶.

Chitosan atau β -(1-4)2 *acetamido-D-glucosamine* merupakan turunan dari chitin yang diekstraksi dari cangkang kerang, kepiting, dan jamur setelah melewati tahap *chemical deacetylation*. *Chitosan* memiliki kemampuan untuk *osteocondutive* meregenerasi tulang, *biocompatible*, *biodegradable*, menginduksi untuk proliferasi pertumbuhan cell, antimikroba, antioksidan, antitumor, dan menstimulasi *growth factor*, sehingga *chitosan* sering dimanfaatkan sebagai bahan dasar pembuatan *scaffold* dan *bone graft*⁷. Penelitian ini mengkombinasikan *Chitosan 92,5% Degree Deacetylation* (DD), 400kDa dengan *Platelet Rich Plasma* (PRP) yang diaplikasikan dalam sediaan gel. *Degree Deacetylation* yang tinggi menyebabkan *chitosan* semakin *soluble* dan semakin mudah untuk terdegradasi dan memberikan efeknya terhadap penyembuhan dan regenerasi tulang⁸. *Chitosan* yang telah terdegradasi melekat pada permukaan sel dan meningkatkan aktivitas regenerasi jaringan⁹. Kerja PRP dipengaruhi oleh *chitosan*, setelah terdegradasi menjadi *chitosan* terurai. *Chitosan* terurai akan mengaktifkan *growth factors* untuk proses penyembuhan luka dan regenerasi tulang alveolar¹⁰.

Platelet Rich Plasma (PRP) merupakan plasma yang kaya akan platelet yang mengandung *growth factors* yang berperan dalam proses penyembuhan luka dan menginduksi regenerasi tulang¹¹. *Growth factors* yang terdapat dalam *Platelet Rich Plasma* (PRP) akan bereaksi segera setelah teraktivasi trombin pada soket pasca ekstraksi¹². *Growth factors* akan menstimulasi

sel *osteoprogenitor* berdiferensiasi menjadi sel osteoblas. Osteoblas akan mensintesis dan mensekresikan matriks organik sebagai marker terjadinya proses remineralisasi serta regenerasi tulang. Matriks organik yang disekresikan seperti kolagen tipe I, *osteocalcin*, *osteonectin*, *osteopontin*, *Receptor Activator of Nuclear Factor Kappa- β Ligand* (RANKL), *Osteoprotegerin* (OPG), *proteoglycans*, dan *latent protases*¹³. Berdasarkan latar belakang di atas peneliti mengkombinasikan PRP dan *chitosan* dalam bentuk gel untuk meningkatkan proses penyembuhan luka dan regenerasi tulang pada soket pasca ekstraksi gigi dilihat dari peningkatan jumlah osteoblas.

Penelitian ini bertujuan untuk menganalisa gel kombinasi PRP dan *chitosan* terhadap peningkatan jumlah osteoblas sebagai *bone regeneration* pada luka pasca ekstraksi gigi tikus wistar. Manfaat penelitian ini memberikan informasi gel kombinasi PRP dan *chitosan* dapat digunakan sebagai *bone regeneration* dan berpengaruh langsung terhadap proses penyembuhan luka pada soket pasca ekstraksi gigi.

METODE PENELITIAN

Penelitian ini merupakan penelitian *true experimental* dengan *post-test only group design* terhadap 28 sampel tikus wistar yang dibagi menjadi 4 kelompok secara *simple random sampling*. Masing-masing kelompok terdiri dari 7 ekor tikus wistar yang diberi perlakuan berbeda. Kelompok I gel PRP, kelompok II gel kombinasi PRP dan *chitosan*, kelompok III gel *chitosan* dan kelompok IV Povidone Iodine.

Pembuatan Gel :

Gel PRP : Darah diisolasi langsung dari jantung tikus wistar yang berbeda

menggunakan spuit sebanyak 15ml. Selanjutnya 15ml darah dimasukkan *vaculab* yang telah berisi EDTA kemudian di sentrifuse 2000rpm selama 15 menit. Lapisan plasma dipindahkan kedalam syringe 10ml, sentrifuse lagi dengan kecepatan 4000rpm selama 15 menit sampai didapatkan lapisan PRP pada dasar tabung, isolasi 4,5ml PRP dari dasar tabung. CMC Na dilarutkan dalam 100ml aquades, diaduk sampai homogen, campurkan CaCl₂ 1ml dan 0,06gram nipagin serta 1,5ml PRP homogenkan menggunakan mixing applicator selama 5-30 detik sampai membentuk gel PRP. Sebelum aplikasi gel PRP disimpan dalam suhu -20°C.

Gel Kombinasi PRP & chitosan : *chitosan* 4gram yang telah dilarutkan dengan asam acetat 2% sampai membentuk konsentrasi 4% dicampur dengan 1,5ml PRP. Kemudian nipagin 0,06 gram dan glycerin 1ml ditambahkan kedalam campuran PRP dan *chitosan*. Homogenkan menggunakan mixing applicator sampai membentuk konsistensi gel. Gel kombinasi PRP dan *chitosan* disimpan dalam suhu -20°C sebelum diaplikasikan.

Gel chitosan : *chitosan* 4gram dilarutkan dalam 100ml acetic acid 2% sampai mendapatkan *chitosan* konsentrasi 4%. Kemudian nipagin 0,06gram dan glycerin 1ml ditambahkan kedalam larutan *chitosan*, dicampur menggunakan mixing applicator sampai membentuk konsistensi gel.

Perlakuan Hewan Coba: Tikus wistar jantan berusia 30-60 hari, berat 115-150g diadaptasikan pada kandang berukuran 40cm x 30cm x 25cm dengan lingkungan terkontrol, diberi makan dan minum secara ad libitium. Kandang diberikan tempat makan dan minum yang dibatasi oleh kawat untuk menghindari kontaminasi makanan dengan feses. Temperature ruangan 20-28°C, kelembaban

60-10% dengan siklus cahaya 12 jam terang/gelap. , tikus wistar diberikan sedasi atau general anatesi menggunakan Ketamin 0,025ml dan Xylazin 0,025ml. Jaringan ikat yang melekat pada gigi insisivus dipisahkan perlekatannya menggunakan *needle holder*. Selanjutnya menggunakan *needle holder* gigi diluksasikan ke arah bukal/labial, lingual/palatal dan rotasi. Gigi insisivus yang telah goyang kemudian dikeluarkan dari soket. Soket gigi dibersihkan menggunakan saline dan diaplikasikan gel. Gel diinjeksikan kedalam soket gigi insisivus sebanyak 0,2ml satu kali selama periode penelitian. Tikus wistar diberi makanan yang lunak untuk menghindari perdarahan dan trauma pada area soket.

Pembuatan & Pembacaan Preparat: Jaringan rahang yang telah diisolasi difiksasi menggunakan *Neutral Buffer Formalin* 10% (NBF 10%) untuk mencegah perubahan jaringan post mortem agar tetap awet. Jaringan kemudian didekalsifikasi menggunakan *formic acid* HCl 10%. diganti setiap hari sampai dekalsifikasi sempurna dan dilanjutkan sampai tahap pembuatan blok paraffin. Jaringan dipotong menggunakan mikrotom dengan ketebalan 4 μ , dipanaskan dalam water bath untuk menghilangkan sisa paraffin. Preparat kemudian dilakukan pewarnaan *Immuno Histo Chemistry* (IHC) dengan antibody *osteocalcin rats*. Pembacaan jumlah osteoblas pada jaringan dilakukan secara mikroskopis dengan perbesaran 400X dalam 5 lapang pandang.

Analisa Hasil: Hasil perhitungan jumlah osteoblas pada masing-masing kelompok dilakukan statistik dengan uji normalitas menggunakan uji *Shapiro-wilk*, sampel kurang dari 50. Uji homogenitas menggunakan uji Levene statistic. Setelah data terdistribusi normal dan homogen dilanjutkan dengan uji parametrik, analisa data menggunakan

program SPSS. Mengetahui efek *chitosan*, PRP dan kombinasi PRP-*chitosan* terhadap peningkatan jumlah osteoblas menggunakan uji *one way ANOVA*. Uji kemudian dilanjutkan ke uji *Post Hoc* LSD untuk mengetahui intervensi yang paling berpengaruh terhadap peningkatan jumlah osteoblas.

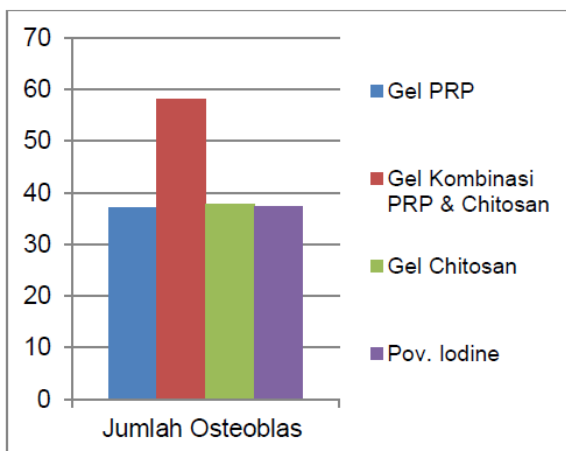
HASIL PENELITIAN

Hasil pemeriksaan osteoblas pada penyembuhan luka soket alveolar pasca ekstraksi gigi hari ke-14 sebagai berikut.

Tabel 1 Rerata Jumlah Osteoblas pada Kelompok Perlakuan

No	Kelompok	Jumlah	Rata-rata+SD
1	Gel PRP	7	37,0 ± 1,15
2	Gel PRP dan Chitosan	7	58,0 ± 2,16
3	Gel Chitosan	7	37,7 ± 1,38
4	Gel Povidone Iodine	7	37,2 ± 1,38

Perbedaan jumlah osteoblas pada masing-masing kelompok diilustrasikan dalam Gambar 1 berikut.



Gambar 1.1. Rata-rata jumlah osteoblas pada kelompok perlakuan

Data kemudian diuji homogenitas dan normalitas, didapatkan hasil data berdistribusi normal dan homogen $p > 0,05$, memenuhi syarat untuk uji *one way ANOVA*.

Tabel 2. Hasil uji one way ANOVA

Kelompok	Osteoblas	Sig.
	Mean + SD	
Gel PRP	37,0 ± 1,15	,000
Gel PRP dan Chitosan	58,0 ± 2,16	
Gel Chitosan	37,7 ± 1,38	
Gel Povidone Iodine	37,2 ± 1,38	

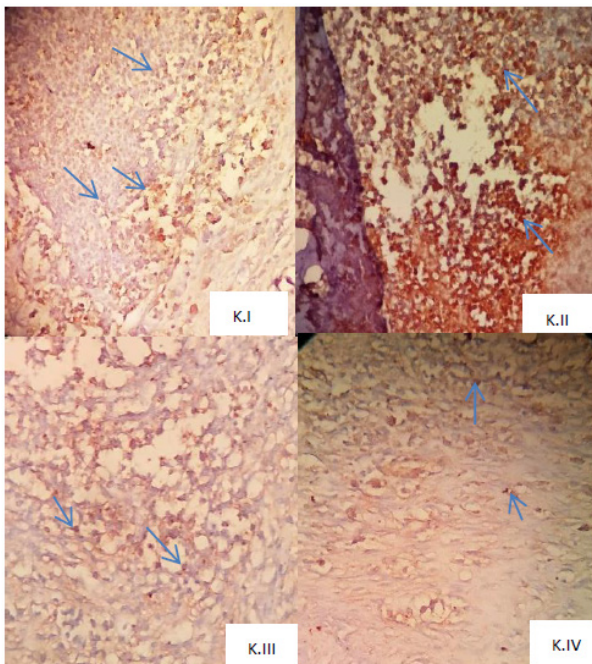
Berdasarkan data Tabel 2 terdapat variasi data signifikan $p < 0,05$ ($p = 0,000$ $\alpha = 0,05$) menunjukkan paling tidak terdapat 2 kelompok yang memiliki mean yang berbeda. Untuk mengetahui kelompok manakah yang memiliki mean yang berbeda dan jumlah osteoblas paling signifikan maka uji dilanjutkan dengan uji *post hoc* LSD dengan hasil pada Tabel 3 menunjukkan terdapat perbedaan jumlah osteoblas pada kelompok dengan kelompok pembandingan jika memiliki signifikansi $p < 0,05$ dan tidak terdapat signifikansi jumlah osteoblas terhadap kelompok pembandingan jika signifikan $p > 0,05$.

Tabel 3. Hasil uji post hoc LSD

Kelompok	Kelompok	Sig.
	Gel Chitosan	,402
	Pov. Iodine	,736
Gel PRP dan Chitosan	Gel PRP	,000
	Gel Chitosan	,000
	Pov. Iodine	,000
Gel Chitosan	Gel PRP	,402
	Gel PRP & Chitosan	,000
	Pov. Iodine	,613

Berdasarkan hasil pengamatan histologis terdapat ekspresi osteoblas pada penyembuhan luka soket pasca ekstraksi setelah aplikasi 14 hari ditunjukkan sel berwarna

cokelat pada gambar 2. dibawah ini.



Gambar 2. Osteoblas dalam Jaringan Tulang Soket Pasca Ekstraksi. Perbesaran 400X. K.I kelompok gel PRP, K.II Kelompok gel kombinasi PRP dan Chitosan, K.III kelompok gel Chitosan dan K.IV kelompok Povidone Iodine.

DISKUSI

Berdasarkan hasil analisa statistik terdapat perbedaan jumlah osteoblas yang signifikan antara kelompok gel kombinasi PRP dan *chitosan* terhadap kelompok gel PRP, Povidone Iodine dan gel *chitosan* ($p=0,000$). Sedangkan kelompok gel PRP memiliki jumlah osteoblas yang tidak berbeda jauh dengan Povidone Iodine ($p=0,736$) dan gel *chitosan* ($p=0,402$) $p>0,05$ $\alpha=0,05$ setelah diaplikasikan pada soket pasca ekstraksi hari ke-14.

Hal tersebut dikarenakan kemampuan PRP meregenerasi tulang tergantung pada teraktivasi *growth factors* oleh thrombin dan distribusi dari *growth factors*. PRP yang dicampur dengan material lain saat aplikasinya dapat membantu atau menghambat aktivasi dan transportasi *growth factors* yang ada

dalam PRP¹⁴. Berdasarkan penelitian Tsay dkk. (2005) menyatakan sekresi *growth factors* pada PRP gel dapat dipengaruhi penambahan material gelnya. PRP gel dapat lebih efektif mensekresikan *growth factors* jika menggunakan material *bovin thrombin* atau TRAP BS. *Bovine thrombin* dalam campuran PRP dapat mempengaruhi factor V, XI dan thrombin yang dibutuhkan untuk aktivasi *growth factors* pada PRP. Begitu juga dengan TRAP BS akan mengaktivasi *thrombin-signaling cell* untuk membentuk thrombin yang dibutuhkan oleh PRP¹⁵.

Gel PRP pada penelitian ini terbuat dari PRP ditambahkan material pengikat, yaitu CMC Na. CMC Na memiliki sifat netral dan daya ikat kuat sehingga dapat menjadi gelling-agent yang baik dan sering dikombinasikan dengan gliserin untuk meningkatkan daya sebar gel¹⁶.

Penambahan gliserin pada CMC Na sebagai basis gel juga dilakukan untuk meningkatkan daya sebar PRP pada area luka. Sifat netral CMC Na meunjukkan CMC Na tidak memiliki pengaruh terhadap PRP. Penggunaan basis CMC Na tidak dapat membantu tersekresikannya *growth factors* pada PRP untuk meregenerasi tulang. Hal tersebut dapat dilihat dari rerata jumlah osteoblas kelompok gel PRP (37,0 + 1,15) lebih sedikit dibandingkan kelompok kontrol Povidon Iodine (37,2 + 1,38). Povidone Iodine mempengaruhi regenerasi tulang melalui jalur anti-inflammatory dan antimikrobal efek. Povidone memodulasi reaksi oksidasi yang terbentuk saat injuri, kemudian menghambat kerja TNF- α dan *Metaloproteinase* yang berperan dalam kerusakan jaringan. Povidone Iodine menginduksi sitokin untuk meningkatkan kerja makrofag, monosit dan limfosit T sehingga terjadi proses penyembuhan luka dan melindungi luka dari risiko infeksi¹⁷.

Regenerasi tulang soket pasca ekstraksi terjadi pada kelompok aplikasi gel *chitosan* dengan jumlah osteoblas $37,7 + 1,38$ pada hari ke-14 aplikasi gel. Rerata jumlah osteoblas pada kelompok gel *chitosan* lebih meningkat dibandingkan kelompok gel PRP ($37,0 + 1,15$) dan Povidone Iodine ($37,2 + 1,38$) namun tidak berbeda jauh. Peningkatan jumlah osteoblas setelah aplikasi gel *chitosan* karena *chitosan* memiliki sifat hemostatik, antimikroba, biokompatibel dan *biodegradable* yang berperan dalam proses penyembuhan luka dan regenerasi jaringan¹⁸. *Chitosan* memberikan efeknya setelah terdegradasi lysozim dalam tubuh. Terdegradasinya *chitosan* dipengaruhi oleh kelarutan *chitosan* yang bergantung pada pH, berat molekul dan *Degree of Deacetylationn (DD)*. *Chitosan* lebih mudah terdegradasi dalam keadaan larut dan *chitosan* hanya akan larut pada $pH < 6,2$ dengan berat molekul 4200-8200 kDa dan DD $> 85-92\%$ ¹⁹.

Setelah gel diaplikasikan pada soket pasca ekstraksi, *chitosan* terurai langsung mengaktifasi thrombin yang ada dibawah lapisan sel endotel dan mengaktifasi platelet yang ada pada permukaan luka untuk membentuk bekuan darah. *Chitosan* terurai juga akan berinteraksi dengan sel leukosit untuk melepaskan sitokin dan meningkatkan infiltrasi PMNs pada area luka. Interaksi *chitosan* dengan sel osteoprogenitor menyebabkan sel berdiferensiasi menjadi osteoblas *mature* yang berperan dalam regenerasi tulang²⁰. Kemampuan *chitosan* langsung berinteraksi dengan sel osteoprogenitor dan PMNs pada area luka menyebabkan *chitosan* lebih efektif meregenerasi tulang jika dibandingkan dengan gel PRP ($37,0 + 1,15$) $p > 0,05$ ($p = 0,402$) dan Povidone Iodine ($37,2 + 1,38$) $p > 0,05$ ($p = 0,613$ $\alpha = 0,05$).

Gel kombinasi PRP dan *chitosan* memiliki perbedaan pengaruh yang sangat signifikan terhadap proses regenerasi tulang pada soket pasca ekstraksi gigi. Rerata jumlah osteoblas yang terdeteksi pada kelompok gel kombinasi PRP dan *chitosan* ($58,0 + 2,16$) lebih tinggi dibandingkan dengan rerata jumlah osteoblas pada kelompok gel PRP ($37,0 + 1,15$), gel *chitosan* ($37,4 + 1,51$) dan Povidone Iodine ($37,2 + 1,11$) $p < 0,05$ ($p = 0,000$ $\alpha = 0,05$). Hal ini disebabkan kombinasi PRP didalam *chitosan* dapat menginduksi penyembuhan dan regenerasi tulang dengan melepaskan *cytokine inflammatory* dan *growth factors* setelah teraktivasi thrombin. Meningkatnya IL-1, IL-6, TNF- α dan *growth factors* menginduksi aktivitas migrasi sel, proliferasi, diferensiasi dan maturasi sel osteoblas selama 7-10 hari²¹. *Growth factors* yang dilepaskan PRP terdiri atas *Insulin like Growth Factors (IGF)*, *Epidermal Growth Factors (EGF)*, *Fibroblas Growth Factors (FGF)*, *Vascular Endotelial Growth Factors (VEGF)*, *Platelet Derivate Growth factors (PDGF)* dan *Tumor growth factors- β (TGF- β)*²².

Chitosan yang dikombinasikan dengan PRP akan mempengaruhi pelepasan *growth factors* pada PRP seiring dengan terdegradasinya *chitosan* menjadi *chitosan* terurai. *Chitosan* berperan dalam regulasi dan pelepasan *growth factors* sehingga disekresikan secara perlahan dan lebih efektif berperan dalam proses regenerasi tulang²³. PRP yang dikombinasikan dengan *chitosan* akan diserap oleh *polymer chitosan* dan menyebabkan partikel *chitosan* mengembang. Aplikasi gel kombinasi kedalam soket pasca ekstraksi menyebabkan terdegradasinya *chitosan* dan dilepaskannya PRP dalam bentuk aktif berupa *growth factors* oleh *polymer chitosan*. *Chitosan* terurai yang telah terdegradasi akan membentuk

crosslinking untuk membantu transmisi sel, mendistribusikan metabolit dan *growth factors* melalui media ekstraselular sehingga terjadi proses regenerasi tulang²⁴.

Regenerasi tulang pada dasar soket diawali tersekresikannya PDGF. PDGF menginduksi *mitogenesis Mesencymal Stem Cells (MSCs)* dan osteoblas pada dasar soket. Selanjutnya PDGF memberikan signal kepada makrofag untuk meningkatkan mitogenesis makrofag, menarik neutrophil dan fibroblas ke area luka. PDGF juga dibantu oleh FGF untuk meningkatkan mitogenesis MSCs dan osteoblas. MSCs yang telah terbentuk mengalami proliferasi yang terus meningkat dipengaruhi TGF- β . Selain itu IGF bersama EGF juga berperan dalam proses proliferasi serta diferensiasi osteoblas dan osteoprogenitor pada proses regenerasi tulang²⁵. VEGF berperan dalam proses angiogenesis dengan menginduksi sel endotel membentuk vaskularisasi baru pada area luka, sehingga MSC dan osteoblas yang telah berdiferensiasi memiliki nutrisi membentuk jaringan tulang yang baru²⁶.

Growth factors yang disekresikan dalam proses penyembuhan luka umumnya memiliki life span yang singkat. Namun dengan dikombinasikannya PRP dengan *chitosan life span* dan sekresi *growth factors* pada PRP menjadi terkontrol dan lebih lama. *Chitosan* yang dikombinasikan dengan *growth factors* sekresinya masih terus berlangsung selama 24 hari dengan pelepasan *growth factors* yang meningkat dari hari ke-2 *chitosan* terdegradasi²⁷. Penelitian ini memanfaatkan sifat *biodegradable* dan biokompatibel dari *chitosan* serta *growth factors* yang terkandung dalam PRP. Gel kombinasi PRP dan *chitosan* lebih efektif meningkatkan jumlah osteoblas untuk meregenerasi tulang pada soket pasca

ekstraksi gigi, dibandingkan dengan Povidone Iodine, gel PRP atau gel *chitosan* saja.

KESIMPULAN

Gel kombinasi PRP dan *chitosan* memiliki efek yang lebih maksimal dan lebih efektif dalam meningkatkan jumlah osteoblas pada regenerasi tulang soket pasca ekstraksi dibandingkan gel PRP tanpa kombinasi dan gel *chitosan* tanpa kombinasi. Gel PRP atau gel *chitosan* tanpa kombinasi memiliki efek minimal yang hampir sama dalam meningkatkan jumlah osteoblas pada regenerasi tulang soket pasca ekstraksi.

DAFTAR PUSTAKA

1. RIKESDAS. Riset Kesehatan Dasar (RISKESDAS) 2013. Lap Nas 2013. 2013;1–384.
2. Fragiskos D fragiskos. Simple Tooth Extraction. Oral Surgery. Berlag Berlin Heidelberg: Springer; 2007. 73 p.
3. Pitekova L, Satko I, Novotnakova D. Complications After Third Molar Surgery. Bratislava Med J [Internet]. 2010;111(5):296–8. Available from: www.bmj.sk.
4. Jamjoom A, Cohen R. Grafts for Ridge Preservation. J Funct Biomater [Internet]. 2015;6(3):833–48. Available from: <http://www.mdpi.com/2079-4983/6/3/833/>
5. Kubilius M, Kubilius R, Gleiznys A. The preservation of alveolar bone ridge during tooth extraction. Balt Dent Maxillofac J [Internet]. 2012;14(1):3–11. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22617329>
6. Avérous L, Pollet E. Environmental Silicate Nano-Biocomposites. Green Energy Technol [Internet]. 2012;50(10.1007/978-1-4471-4108-2_2,):13–39. Available from: <http://www.springer.com/978-1-4471-4101-3>
7. Venkatesan J, Kim S. Chitosan Composites for Bone Tissue Engineering — An. 2010;2252–66.
8. Díaz A, Katsarava R, Puiggalí J. Synthesis, Properties and Applications of Biodegradable Polymers Derived from Diols and Dicarboxylic Acids: from Polyesters to Poly(Ester Amide)s. Int J Mol Sci [Internet]. 2014;15(5):7064–123. Available from: www.mdpi.com?journal/ijms
9. Nygaard JN, Strand SP, Vårum KM, Draget KI, Nordgård CT. Chitosan: Gels and Interfacial Properties. Polymers (Basel) [Internet]. 2015;7:552–79. Available from: www.mdpi.com/

- journal/polymers
10. Letivo A. The Effects of Chitosan in The Healing Process of The Oral Mucosa. [Portugis]: Intituto De Ciencias Da Saude; 2015.
 11. Rodriguez IA, Kalaf EAG, Bowlin GL, Sell SA. Platelet-Rich Plasma in Bone Regeneration : Engineering the Delivery for Improved Clinical Efficacy. 2014;2014:1–15. Available from: <http://dx.doi.org/10.1155/2014/392398>
 12. Smith RG, Gassmann CJ, Gampbell MS. Platelet-rich Plasma : Properties and Clinical Applications. *Lancaster Gen Hosp*. 2007;2(2):73–8.
 13. Jayakumar P, Di Silvio L. Osteoblasts in bone tissue engineering. In: Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers Part H, *Journal of Engineering in Medicine* [Internet]. 2010. p. 1415–40. Available from: <https://www.researchgate.net/publication/49804522>
 14. Khoshzaban A, Heidari-keshel S, Aghazadeh S, Bashtar M. Radiographic & Histopathological Analysis in Calvarias Bone Regeneration Process by Platelet-Rich Plasma , Platelet-Rich Plasma – Gel and Auto Bone Chips in Rat. *J Paramed Sci*. 2010;1(1):40–5.
 15. Tsay RC, Vo J, Burke A, Eisig SB, Lu HH, Landesberg R. Differential Growth Factor Retention by Platelet-Rich Plasma Composites. *J Oral Maxillofac Surg*. 2005;63(4):521–8.
 16. Aponno J V, Yamlean PVY, Supriati HS. Uji Efektifitas Sediaan Gel Ekstrak Etanol Daun Jambu Biji (Psidium Guajava Linn) Terhadap Penyembuhan Luka yang Terinfeksi Bakteri *Staphylococcus Aureus* pada Kelinci (*Orytolagus Cuniculus*). *PHARMACON J Ilm Farm – UNSRAT Agustus*. 2014;3(3):2302–493.
 17. Bigliardi PL, Alsagoff SAL, El-Kafrawi HY, Pyon JK, Wa CTC, Villa MA. Povidone Iodine in Wound Healing: A Review of Current Concepts and Practices. *Int J Surg* [Internet]. 2017;44:260–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijssu.2017.06.073>
 18. Nwe N, Furuike T, Tamura H. The Mechanical and Biological Properties of Chitosan Scaffolds For Tissue Regeneration Templates Are Significantly Enhanced by Chitosan from *Gongronella Butleri*. *Materials (Basel)*. 2009;2(2):374–98.
 19. Gomes LP, Paschoalin VMF, Del Aguila EM. Chitosan Nanoparticles: Production, Physicochemical Characteristics and Nutraceutical Applications. *Rev Virtual Quim* [Internet]. 2017;9(1):387–409. Available from: <http://rvq.s bq.org.br>
 20. Giorgetti APO, César Neto JB, Casati MZ, Sallum EA, Nociti Júnior FH. Cigarette Smoke Inhalation Influences Bone Healing of Post-Extraction Tooth Socket: A Histometric Study In Rats. *Braz Dent J*. 2012;23(3):228–34.
 21. Oryan A, Alidadi S, Moshiri A. Platelet-Rich Plasma for Bone Healing and Regeneration. *Expert Opin Biol Ther* [Internet]. 2015;2598(November 2015):1–20. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1517/14712598.2016.1118458>
 22. Davis VL, Abukabda AB, Radio NM, Witt-Enderby PA, Clafshenkel WP, Cairone JV, et al. Platelet-Rich Preparations to Improve Healing. Part I: Workable Options For Every Size Practice. *J Oral Implantol*. 2014;40(4):500–10.
 23. Chen MC, Mi FL, Liao ZX, Sung HW. Chitosan: its Applications in Drug-Eluting Devices. *Adv Polym Sci* [Internet]. 2011;243(1):185–230. Available from: www.springerlink.com
 24. Mohammed MA, Syeda JTM, Wasan KM, Wasan EK. An Overview of Chitosan Nanoparticles and its Application in Non-Parenteral Drug Delivery. *Pharmaceutics* [Internet]. 2017;9(4):1–26. Available from: <http://www.mdpi.com/journal/pharmaceutics>
 25. Lieberman JR, Daluiski A, Einhorn TA. The Role of Growth Factors in the Repair of Bone. *Biology and Clinical Applications. J Bone Joint Surg Am* [Internet]. 2002;84–A(6):1032–44. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12063342>
 26. Tozzi G, Mori A De, Oliveira A, Roldo M. Composite Hydrogels for Bone Regeneration. *Materials (Basel)*. 2016;1–24.
 27. Lv B, Wang Y, Chen W. Preparation, Characterization, and Bioactivity of Chitosan Microspheres Containing Basic Fibroblast Growth Factor. *J Nanomater* [Internet]. 2014;2014:1–7. Available from: <http://www.hindawi.com/journals/jnm/2014/534287/>