

## **Pengaruh viskositas kitosan gel terhadap penggunaannya di proses penyembuhan luka**

**Sularsih**

Departement of dental material and technology, Dentistry faculty of Hang Tuah University, Surabaya

### **Abstract**

**Latar belakang:** Serbuk kitosan ketika dilarutkan dengan larutan asam asetat akan menjadi larutan yang cukup kental. Kemampuan bahan kitosan tergantung dari kekentalan atau viskositas dari larutannya. Viskositas akan menentukan kemampuan dalam aplikasinya. **Tujuan:** Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui proliferasi sel pada penyembuhan luka pencabutan gigi dengan menggunakan bahan kitosan yang memiliki viskositas yang berbeda. **Bahan dan metode:** Rattus norvegicus wistar jantan, umur 8-16 minggu, dibagi menjadi 2 kelompok, kelompok 1 dengan pemberian kitosan gel dengan viskositas tinggi dan kelompok 2 dengan pemberian kitosan gel dengan viskositas yang rendah. Kitosan diaplikasikan ke soket pencabutan gigi. Tulang mandibula tikus dipotong setelah 7 dan 14 hari, kemudian dilakukan pemeriksaan histopatologi anatomi untuk mengamati proliferasi sel. Data dianalisa dengan t test. **Hasil:** Penelitian ini menunjukkan hasil yang signifikan berbeda pada proliferasi sel antara kelompok kitosan yang memiliki viskositas tinggi dan rendah. Kelompok dengan kitosan yang berviskositas tinggi memiliki jumlah proliferasi sel yang paling besar. **Kesimpulan:** Viskositas akan mempengaruhi absorpsi dari kitosan dan kemampuannya dalam menunjang proliferasi sel pada proses penyembuhan luka.

**Kata kunci:** Viskositas, Kitosan, Proliferasi Sel

### **Korespondensi:**

**Sularsih**

Departemen Ilmu Material  
Kedokteran Gigi, Fakultas  
Kedokteran Gigi Universitas Hang  
Tuah. Jl. Arif Rachman Hakim 150  
Surabaya 60111. E-mail: [l4rs\\_  
dentist@yahoo.co.id](mailto:l4rs_dentist@yahoo.co.id)

## ***The effect of viscosity chitosan gel to the application on wound healing process***

### **ABSTRACT**

**Background:** Chitosan powder when dissolved with acetat acid solution gives viscous solution. The accessibility of chitosan depends on viscosity of its solution. The viscosity determines the extent of penetration of chitosan. **Purpose:** The aim of this study was to account the proliferation cells on wound healing process of dental extraction using different viscosity of chitosan gel. **Methods:** Rattus norvegicus strain wistar male, aged 8-16 weeks, divided into 2 treatment groups namely group 1 which given chitosan gel with high viscosity and group II which given chitosan with low viscosity. Chitosan were applied into the socket of dental extraction. Rat was decapitated 7 and 14 days after chitosan application and the jaw in the treated regions and control group were cut for histopatological to observe the proliferation cells. Data were analyzed using t test. **Results:** The result showed significant differences of proliferation cells between groups with high and low viscosity of chitosan. The group with high viscosity of chitosan have more higher of proliferation cells. ( $p < 0,05$ ) **Conclusion:** The viscosity can influence the absorbtion of chitosan that accessibility to its application on proliferation cells of wound healing process.

**Keys words:** viscosity.chitosan.proliferation cells.

### **Pendahuluan**

Biomaterial kitosan merupakan produk deasetilasi kitin dengan basa kuat yang merupakan polimer linear berberat molekul tinggi dari 2-deoksi-2-amino glukosa. Kitosan memiliki sifat yang sama dengan sifat polimer kationik yaitu tidak laut dalam air atau larutan alkali di atas pH 6,5. Kitosan lebih mudah larut dalam asam organik cair seperti asam asetat, asam formiat dan asam mineral lain kecuali sulfur.<sup>1</sup> Serbuk kitosan ketika dilarutkan dengan larutan asam asetat akan menjadi larutan yang cukup kental atau gel.<sup>2,3</sup> Kualitas dari kitosan dan kitin

ditentukan oleh besar derajat deasetilasi, berat molekol dan viskositas bahan kitosan. Semakin tinggi derajat deasetilasi maka semakin semakin tinggi kualitas bahan kitosan.<sup>2,3,4</sup>

Viskositas kitosan bergantung dari berat molekol kitosan, konsentrasi larutan, derajat deasetilasi, pH dan suhu. Tinggi rendahnya viskositas kitosan juga dipengaruhi pada proses pembuatannya baik perlakuan fisik meliputi penggilingan, pemanasan dan autoklaf maupun perlakuan kimia yaitu faktor suhu.<sup>4,5</sup> Peningkatan viskositas diduga karena semakin meningkatnya kandungan asetil dalam kitosan sehingga dengan kenaikan

suhu yang semakin tinggi maka semakin banyak asetil yang terlarutkan, sehingga derajat deasetilasi meningkat dan viskositas meningkat atau sediaan kitosan menjadi lebih kental seperti gel dengan meningkatnya suhu.<sup>5</sup> Viskositas gel kitosan akan meningkat dengan meningkatnya derajat deasetilasi dan besar berat molekul kitosan. Kitosan yang memiliki viskositas yang tinggi disebabkan karena besar derajat deasetilasinya yang tinggi sehingga mudah larut dalam larutan asam asetat dan menjadi kental seperti gel dengan meningkatnya suhu.<sup>3,4,6</sup> Dari penelitian sebelumnya oleh peneliti, Sularsih (2011) sediaan kitosan gel yang cukup kental, memiliki viskositas yang cukup memudahkan aplikasi kitosan dalam penyembuhan luka pencabutan gigi tikus *Rattus Norvegicus*. Hal ini menunjukkan bahwa viskositas gel dari kitosan dapat mempengaruhi kualitas dari bahan kitosan yang akan digunakan. Viskositas dari sediaan kitosan gel sangat penting dalam mendukung aplikasinya. Dengan kekentalan atau viskositas yang sesuai diharapkan akan mempermudah aplikasi di bidang kedokteran gigi terutama dalam proses penyembuhan luka.

Pada prinsipnya proses penyembuhan luka pencabutan gigi meliputi proses inflamasi, proliferasi dan remodeling. Pada fase proliferasi ditandai dengan berkurangnya jumlah sel – sel inflamasi dan tanda – tanda peradangan, munculnya sel fibroblas yang berproliferasi, pembentukan pembuluh darah baru, dan epitelialisasi pada permukaan bekuan darah.<sup>6,7</sup> Sel osteoblas juga akan berdeferensiasi dan berproliferasi membentuk sel tulang baru untuk mengisi soket pencabutan gigi.<sup>2,8</sup> Penelitian tentang efektifitas penggunaan biomaterial kitosan dalam menunjang proses penyembuhan luka di bidang kedokteran gigi telah banyak dilakukan. Kitosan gel dapat berperan sebagai bahan antiinflamasi, menstimulasi proliferasi sel dan remodeling pada tahapan proses penyembuhan luka. Penelitian ini

bertujuan untuk mengetahui proliferasi sel pada penyembuhan luka pencabutan gigi dengan menggunakan bahan kitosan yang memiliki viskositas yang berbeda.

## **Bahan dan metode**

Pada penelitian ini menggunakan serbuk kitosan dengan merk SIGMA-ALDRICH yang memiliki viskositas yang tinggi (Product number= 419419, Lot number= MKBH5816V) dan kitosan dengan viskositas 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.

Sampel penelitian menggunakan tikus *Rattus norvegicus* wistar jantan, umur 8-16 minggu dengan berat badan 150-200 gram, yang dibagi menjadi 2 kelompok yaitu kelompok pertama dengan pemberian kitosan gel dengan viskositas tinggi dan kelompok kedua dengan pemberian kitosan gel dengan viskositas yang rendah. Kitosan disiapkan dengan bentuk gel dalam tabung reaksi, yang telah disterilkan menggunakan *autoclave* suhu 121° C 121°C selama 15 menit tekanan 1 atm. Kitosan gel dengan konsentrasi 1% (w/v) sebanyak 0,1 ml/200 gr bb 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 7 dan ke 14 setelah pemberian perlakuan. Tulang rahang di daerah interdental gigi *Incisive* rahang bawah dipotong dan dimasukkan dalam larutan fiksasi menggunakan *buffer formalin*

**Sularsih:** Pengaruh viskositas kitosan gel terhadap penggunaannya di proses penyembuhan luka

10 %. Setelah dilakukan fiksasi 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  $\mu\text{m}$ . Sayatan jaringan ditempelkan pada gelas objek yang siap untuk dilakukan pemeriksaan histopatologi anatomi dengan pengecatan *hematoksin eosin* (HE). Pengamatan proliferasi sel dilakukan pada sepertiga bagian apikal gigi yang berbatasan

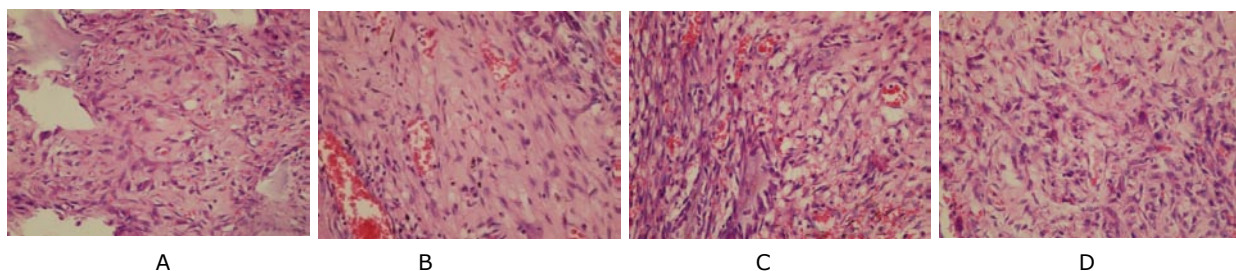
dengan tulang alveolaris. Pembesaran 100 kali untuk melihat semua lapang pandang, kemudian ditingkatkan dengan pembesaran 400 kali.

### Hasil penelitian

Rerata dan simpang baku jumlah sel fibroblas pada setiap kelompok kitosan dengan viskositas tinggi dan kelompok kitosan dengan viskositas rendah pada lama pengamatan 7 dan 14 hari dapat dilihat pada tabel 1 dan gambar 1.

**Tabel 5.1. Rerata dan simpang baku jumlah sel fibroblas pada kelompok kitosan dengan viskositas tinggi dan kitosan dengan viskositas rendah. Pada lama pengamatan 7 dan 14 hari**

Variabel	Perlakuan	7 hari		14 hari	
		Rerata	SD	Rerata	SD
Proliferasi sel fibroblas	Viskositas tinggi	45,75	1.96	58.66	1.77
	Viskositas rendah	33.65	1.98	40,21	1.97



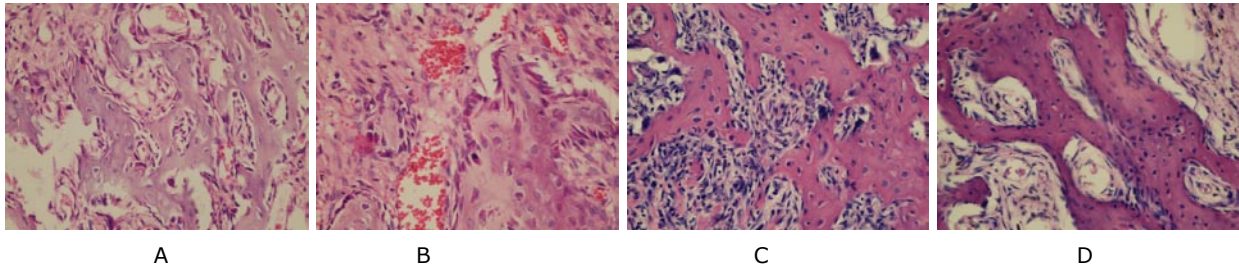
**Gambar 1. Sediaan Histopatologi Anatomi jumlah sel fibroblas pada pengamatan 7 dan 14 hari (400x). A. Kelompok dengan viskositas tinggi pengamatan 7 hari, B. Kelompok dengan viskositas rendah pengamatan 7 hari, (C) Kelompok dengan viskositas tinggi pengamatan 14 hari, (D) Kelompok dengan viskositas rendah pengamatan 14 hari.**

Berdasarkan tabel 1 dan gambar 1 menunjukkan rerata jumlah sel fibroblas pada rerata jumlah sel fibroblas pada pengamatan 7 dan 14 hari setelah perlakuan, kelompok kitosan dengan viskositas tinggi lebih banyak dibandingkan kelompok kitosan dengan viskositas rendah.

Rerata dan simpang baku jumlah sel osteoblas pada setiap kelompok kitosan dengan viskositas tinggi dan kelompok kitosan dengan viskositas rendah pada lama pengamatan 7 dan 14 hari dapat dilihat pada tabel 2 dan gambar 2.

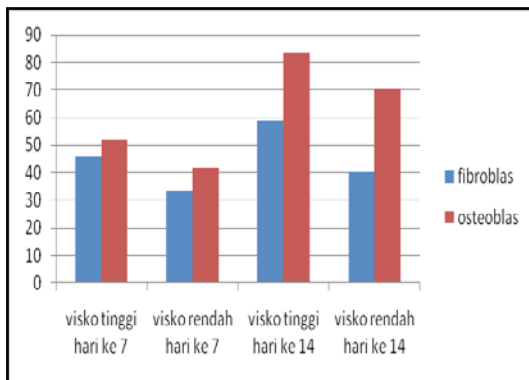
**Tabel 5.2. Rerata dan simpang baku jumlah sel osteoblas pada kelompok kitosan dengan viskositas tinggi dan kitosan dengan viskositas rendah. Pada lama pengamatan 7 dan 14 hari**

Variabel	Perlakuan	7 hari		14 hari	
		Rerata	SD	Rerata	SD
Proliferasi sel Osteoblas	Viskositas tinggi	52,25	3,10	83,12	2,53
	Viskositas rendah	41,85	2,87	70.45	2,22



**Gambar 1. Sediaan Histopatologi Anatomi jumlah sel osteoblas pada pengamatan 7 dan 14hari (400x). (A). Kelompok dengan viskositas tinggi pengamatan 7 hari, (B) Kelompok dengan viskositas rendah pengamatan 7 hari, (C) Kelompok dengan viskositas tinggi pengamatan 14 hari, (D) Kelompok dengan viskositas rendah pengamatan 14 hari.**

Berdasarkan tabel 2 dan gambar 2 menunjukkan rerata jumlah sel osteoblas pada rerata jumlah sel osteoblas pada pengamatan 7 dan 14 hari setelah perlakuan, kelompok kitosan dengan viskositas tinggi lebih banyak dibandingkan kelompok kitosan dengan viskositas rendah. Grafik rerata proliferasi sel fibroblas dan selosteoblas ditunjukkan pada gambar 3.



**Gambar 3.** Grafik rerata jumlah sel fibroblas dan sel osteoblas pada pengamatan 7 dan 14 hari.

Dari hasil uji t test menunjukkan hasil yang signifikan berbeda pada proliferasi sel baik sel fibroblas maupun sel osteoblas antara kelompok kitosan yang memiliki viskositas tinggi dan rendah. Kelompok dengan kitosan yang berviskositas tinggi memiliki jumlah proliferasi sel yang paling besar.

**Pembahasan**

Kitosan mempunyai sifat bioaktif, biokompatibel dan biodegradabel.

Keterbatasan penggunaan kitosan adalah sifatnya yang tidak larut dalam air. Kitosan juga tidak larut dalam beberapa pelarut organik seperti alkohol, aseton, dimetil formamida dan dimetilsulfoksida, tetapi kitosan larut baik dalam asam asetat dan asam format berkonsentrasi rendah. Kelarutan kitosan dipengaruhi oleh berat molekul dan derajat deasetilasi.<sup>4,13</sup> Karakteristik fisikokimia kitosan seperti fleksibilitas rantai dalam larutan, sifat reologi, ukuran kristal dan kristanilasi kitosan tergantung oleh faktor intrinsik yaitu berat molekul dan derajat deasetilasi.<sup>14</sup> Dengan memiliki berat molekul yang berbeda menyebabkan viskositas larutan menjadi berbeda, dan hal ini sangat berpengaruh terhadap sifat – sifat biologis dari bahan kitosan sehingga akan berpengaruh pada penggunaannya.<sup>4,5</sup>

Dari hasil penelitian menunjukkan kitosan gel dengan viskositas yang tinggi lebih dapat menstimulasi proliferasi sel baik pada sel fibroblas maupun sel osteoblas dengan pengamatan 7 maupun 14 hari. Faktor viskositas menjadi hal yang berperan dalam menentukan efektifitas penggunaan dari kitosan gel. Viskositas adalah kemampuan suatu fluida dalam menahan geseran atau gesekan dari lapisannya dengan besar gaya tertentu yang menimbulkan kecepatan tertentu yang disebabkan oleh gaya kohesi antar molekul.<sup>14</sup> Pada penelitian ini menggunakan serbuk kitosan yang memiliki berat molekul yang berbeda sehingga memiliki viskositas yang berbeda pula. Kitosan dengan

berat molekul tinggi memiliki viskositas yang tinggi. Berat molekul bergantung pada degradasi yang terjadi selama proses deasetilasi. Derajat deasetilasi merupakan prosentase yang menunjukkan gugus asetil yang hilang yang digantikan oleh amina. Dengan semakin banyak kandungan asetil yang terlarutkan, derajat deasetilasi yang tinggi dan meningkatkan suhu pada saat melarutkan akan menyebabkan viskositas semakin tinggi.<sup>3,5</sup>

Serbuk kitosan yang dilarutkan pada larutan asam asetat menghasilkan kitosan dalam sediaan gel. Derajat deasetilasi semakin tinggi maka semakin tinggi kelarutan kitosan dalam larutan asam asetat. Dengan sediaan gel, kitosan yang juga memiliki sifat mukoadesif yang baik mampu mengabsorpsi eksudat, menjaga kelembapan luka dan mudah diaplikasikan pada luka.<sup>10,15</sup> Kitosan dengan viskositas yang tinggi memiliki berat molekul tinggi serta ukuran partikel yang besar sehingga sifat mukoadhesif akan lebih baik terutama dalam menutup luka. Pada penyembuhan luka pencabutan gigi, bekuan darah yang kuat akan terbentuk untuk mencegah terjadinya komplikasi seperti *dry socket* yang disebabkan oleh hilangnya atau hancurnya bentukan bekuan darah pada soket pasca pencabutan gigi.<sup>16,17</sup>

Kitosan yang diaplikasikan pada luka pencabutan gigi dapat menstimulasi sel makrofag untuk meningkatkan produksi sitokin yang berupa TGF- $\beta$  1 dan FGF 2.<sup>18</sup> TGF- $\beta$  1 merupakan sitokin yang paling dominan dilepaskan pada tempat yang terkena trauma atau luka.<sup>7</sup> TGF- $\beta$  1 dan FGF 2 merupakan *growth factors* yang memicu proliferasi sel fibroblas pada penyembuhan luka.<sup>18</sup> Sel Makrofag menjadi sumber growth factor yang penting untuk stimulasi fibroplasia dan angiogenesis. Sel Fibroblas menghasilkan matriks ekstraseluler baru yang perlu untuk mendukung pertumbuhan kedalam, dan pembuluh darah untuk mengangkut oksigen dan nutrisi yang diperlukan untuk

mendukung metabolisme sel. Growth factor, khususnya PDGF, FGF dan TGF  $\beta$ 1, bersama-sama dengan molekul matriks ekstraseluler memacu sel fibroblas dari jaringan sekitar luka untuk berproliferasi, mengekspresikan reseptor integrin yang sesuai dan berpindah kedalam ruang luka. Pada penyembuhan luka, pembentukan pembuluh darah baru sangat perlu untuk mendukung jaringan granulasi yang baru. Angiogenesis merupakan proses yang kompleks berkaitan dengan matriks ekstraseluler pada luka seperti halnya migrasi dan stimulasi mitogenik sel endothel. Induksi angiogenesis juga distimulasi oleh fibroblas growth factor (FGF).<sup>7,8,9</sup>

Pada fase inflamasi diproses penyembuhan luka, yang dimulai dalam beberapa menit ke jam, dapat disertai oleh infeksi yang menyebabkan peningkatan produksi PGE<sub>2</sub>, oleh sebab itu bahan yang dapat menghambat produksi PGE<sub>2</sub> dapat menjadi keuntungan terapeutik dalam penyembuhan luka. Kitosan menekan efek anti inflamasi dengan menghambat *prostaglandin E2* (PGE<sub>2</sub>) dan melemahkan sitokin proinflamasi. PGE<sub>2</sub> membantu pembentukan osteoklas dan memiliki peran yang penting pada resorpsi tulang yang berhubungan dengan inflamasi. Oleh karena kemampuan kitosan yang dapat menurunkan produksi PGE<sub>2</sub>, maka hal ini akan menyebabkan peningkatan jumlah sel osteoblas dalam pembentukan tulang.<sup>8,19,20</sup> Faktor terkuat yang penting dalam menstimulasi osteoblastik pada pembentukan tulang adalah *bone morphogenetic protein-2* (BMP-2).<sup>21,22</sup> Sebagai bahan biokompatibel, kitosan telah banyak digunakan dalam *bone tissue engineering*, diyakini memiliki afinitas tinggi pada sel-sel osteoblastik dan memiliki potensi diferensiasi sel osteoprogenitor dan membantu pembentukan tulang. Kitosan dapat menginduksi differensiasi osteoblastik dalam regenerasi tulang dengan meningkatkan bioaktivitas BMP-2. Kitosan dengan sifatnya yang biokompatibel

dan memiliki osteonduktivitas yang baik dapat dikembangkan sebagai biomaterial dalam penyembuhan tulang.<sup>19,201,21,22</sup>

## Daftar pustaka

1. Djamaludin A, 2009, Pemanfaatan kitosan darilimbah krustacea untuk penyembuhan luka pada mencit, Skripsi, Fakultas matematika dan ilmu pengetahuan alam, IPB, Available <http://repository.ipb.ac.id/bitstream/handle/123456789/11479/G09amd.pdf>
2. Sularsih, Penggunaan kitosan dalam proses penyembuhan luka pencabutan gigi *Rattus norvegicus*. Tesis. Program Magister Fakultas Kedokteran Gigi. Universitas Airlangga. 2011. Hal 35-76
3. Rochima E, 2007. Karakterisasi kitin dan kitosan asal limbah rajungan Cirebon Jawa Barat. *Prosiding seminar nasional dan kongres perhimpunan ahli teknologi pangan Indonesia (PATPI)*. Bandung. 17-18 Juli 2007
4. Yulina I, 2011, Aktivitas antibakteri kitosan berdasarkan perbedaan derajat deasetilasi dan bobot molekul, Thesis, Fakultas pertanian, IPB, hal 4-8
5. Rochima E, Maggy S, Dahrul S, Sugiyono, 2007. Viskositas dan berat molekul kitosan hasil reaksi enzimatis kitin deasetilase isolate. *Prosiding seminar nasional dan kongres perhimpunan ahli teknologi pangan Indonesia (PATPI)*. Bandung. 17-18 Juli 2007
6. Siregar M. Pengaruh berat molekul nanopartikel untuk menurunkan kadar logam besi (Fe) dan zat warna pada limbah industri tekstil jeans. Thesis. Medan: Pascasarjana Universitas Sumatra Utara; 2009.
7. Topazian RG, Goldberg MH. Hupp JR, 2002. *Oral and maxillofacial infections* 4<sup>ed</sup>. United States of America: Elsevier Saunders. pp. 2-157
8. Prabakti Y, 2005. Perbedaan jumlah fibroblast di sekitar luka insisi pada tikus yang diberikan infiltrasi penghilang nyeri Levobupivakain dan yang tidak diberi Levobupivakain. Tesis. Pendidikan Spesialis Anestesi. Fakultas Kedokteran. Universitas Diponegoro. Hal 17-24
9. Nanci A, 2008. *Ten Cate's oral histology : development, structure, and function*, 7<sup>th</sup> ed., St. Louis: Mosby Elsevier, pp 111-115, 379-394
10. Sularsih, 2011. Penggunaan Kitosan Dalam Penyembuhan Luka Pencabutan Gigi *Rattus norvegicus*. Tesis, Program Magister Kedokteran Gigi, Universitas Airlangga, Surabaya, hal 31-53
11. Budianto B, Sularsih, Pengaruh kitosan gel 1 % yang memiliki berat molekul tinggi dan rendah terhadap jumlah sel osteoblas pada penyembuhan luka pencabutan gigi, skripsi, Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Hang Tuah, 2013, hal 17-23
12. Prananingrum W. Jumlah osteoblast like cell dan sintesa kolagen tipe I pada pembentukan dentin reparatif dengan perawatan direct pulp calping gigi tikus *Rattus norvegicus* dengan kitosan. Thesis. Surabaya: Fakultas Kedokteran Gigi. Universitas Airlangga; 2010.
13. Suptijah P, 2006. Deskripsi karakteristik fungsional dan aplikasi kitin kitosan. *Prosiding Seminar Nasional Kitin Kitosan 2006*. Hal 14-24.
14. Kencana A, Perlakuan sonikasi terhadap kitosan, viskositas dan berat molekul kitosan. Skripsi fakultas matematika dan ilmu pengetahuan alam IPB, 2009, hal 2-5
15. Nascimento EG. Evaluation of chitosan gel 1 % silver sulfadiazine as an alternative for burn wound treatment in rats. *Journal of Acta Cirurgica Brasileira*. Vol 24. No 6. 2009. pp. 460-465
16. Kerby JD, Cusick MV, 2012. Recent Advances and Future Directions in Trauma Care, An Issue of Surgical Clinics of North America, 1<sup>st</sup> ed., Volume 92, No

- 4, Philadelphia: Elsevier - Health Sciences Division, pp 823-841
17. Semalty A, 2006. Mucoadhesive Polymers - A Review. Available from <http://www.pharmainfo.net/reviews/mucoadhesive-polymers-review>. Accessed May 11, 2013
  18. Chin L, Halim AS. In vitro models in biocompatibility assessment for biomedical-grade chitosan [derivatives in wound management]. *J. Molecular Science*. Vol 10. No 3. 2009. pp. 1300-1313
  19. Chou C. *Chitosan inhibits prostaglandin E2 formation and cyclooxygenase-2 induction in lipopolysaccharide-treated RAW 264,7 macrophages*. [http://www.sciencedirect.com/science?\\_ob=ArticleUR](http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleUR), Retrieved 25 october 2010
  20. Matsunaga S, Yanagiguchi K, Yamada S, Ohara H. Chitosan Monomer Promotes Tissue Regeneration on Dental Pulp Wounds. *J. Biomed. Mater. Res*. Vol 76A. 2005. pp. 711-720.
  21. Ehnert *et al.*, 2012. Transforming growth factor  $\beta$ 1 inhibits bone morphogenic protein (BMP)-2 and BMP-7 signaling via upregulation of Ski-related novel protein N (SnoN): possible mechanism for the failure of BMP therapy. *BMC Medicine*, 10: 101
  22. Benediktsdóttir BD, 2011. Role of Periostin/Periostin-like-factor in BMP-2 induced osteoblastic differentiation. Thesis, Faculty of Medicine, University Hospital of Zurich, Zurich, pp 3. Available from <http://hdl.handle.net/1946/11631>. Accessed April 1, 2013.
  23. Dai TH, Tanaka M, Huang YY, Hamblin MR, 2011. Chitosan preparations for wounds and burns: antimicrobial and wound-healing effects. *Expert review of anti-infective therapy*, 9(7): 857-879.