

Efek Ekstrak Daun Singkong (*Manihot esculenta*) Terhadap Ketebalan Regenerasi Epitel Lesi Traumatik Pada Mencit BALB/C Jantan

The Effect of Cassava Leaf (Manihot esculenta) Extract for Regeneration Epithelial Thickness of Traumatic Lesions in Male Mice BALB/C

Dewi Novita Rosiana, Iin Eliana T, Erna Sulistyani
Fakultas Kedokteran Gigi, Universitas Jember (UNEJ)
Jln. Kalimantan 37, Jember 68121
E-mail: DPU@unej.ac.id

Abstrak

Lesi traumatik merupakan salah satu lesi yang sering dijumpai pada rongga mulut. Lesi traumatik dapat diatasi dengan pengobatan. Daun singkong (*Manihot esculenta*) memiliki kandungan seperti, vitamin C, vitamin A, protein, flavonoid, saponin, dan triterpenoid yang dapat mempengaruhi proses penyembuhan luka terutama pada proses epitelialisasi. Tujuan penelitian ini untuk mengetahui efek pemberian ekstrak daun singkong (*Manihot esculenta*) terhadap ketebalan epitel mukosa labial mencit yang mengalami lesi traumatik, kemudian untuk mengetahui perbedaan ketebalan epitel mukosa labial mencit yang mengalami lesi traumatik setelah pemberian ekstrak daun singkong (*Manihot esculenta*) selama 7 hari dan 10 hari. Penelitian ini menggunakan mencit BALB/C jantan dengan total sampel 32 ekor. Mencit akan dibagi menjadi 2 kelompok yaitu kelompok kontrol dan kelompok perlakuan. Dosis ekstrak yang diberikan sebesar 25,6 mg/kg bb. Lesi traumatik di buat dengan menempelkan HCl pada bagian mukosa labial mencit. Mencit dikorbankan pada hari ke-7 dan ke-10, kemudian dilakukan pembuatan preparat histologi, dan di ukur ketebalan epitelnya. Data hasil penelitian di uji menggunakan *Kruskal-wallis dan Mann-Whitney*. Hasil penelitian ini menunjukkan kelompok perlakuan hari ke-7 (P1) lebih tebal secara signifikan terhadap kelompok kontrol hari ke-7 (K1) dan kelompok perlakuan hari ke-10 (P2) lebih tipis signifikan terhadap kelompok perlakuan hari ke-7 (P1). Kesimpulan yang dapat ditarik dari penelitian di atas adalah ekstrak daun singkong terbukti dapat mempertebal ketebalan epitel lesi traumatik mencit pada hari ke-7, kemudian ketebalan epitel pada kelompok yang diberi ekstrak daun singkong (*Manihot esculenta*) hari ke-7 (P1) lebih tebal daripada epitel kelompok perlakuan hari ke-10 (P2).

Kata Kunci: ekstrak daun singkong, epitel, lesi traumatik, *Manihot esculenta*.

Abstract

Traumatic lesions was one of the lesions were often found in the oral cavity. Traumatic lesions could be handled by the medication. Cassava leaves (*Manihot esculenta*) it has a variety of content, such as vitamin C, vitamin A, protein, flavonoid and saponin. These substances could affect the wound healing process, especially the regeneration of epithel. The purpose of this study to determine the effects of cassava leaf extract (*Manihot esculenta*) epithelial thickness labial mucosa of mice that experienced traumatic lesions, and to know the difference epithelial thickness labial mucosa of mice that experienced traumatic lesions after given the cassava leaf extract (*Manihot esculenta*) for 7 days and 10 days. This study used mice BALB / C males with a total sample of 32 head. Mice will be divided into 2 groups: control and treatment groups. Traumatic lesions made by gluing HCl on the labial mucosa of mice. Mice were sacrificed on days 7 and 10 for histological process, and measured the epithelial thickness. The data were tested using *Kruskal-wallis and Mann-Whitney*. The results of this study showed the treatment group on day 7 (P1) was significantly thicker the control group on day 7 (K1) and the treatment day 10 (P2) significantly thinner to treatment group on day 7 (P1). The conclusion that can be drawn from the above study was cassava leaf extract proven to thicken the epithelial thickness traumatic lesions of mice on day 7, then the thickness of the epithelium in the group given the extract of leaves of cassava (*Manihot esculenta*) on day 7 (P1) was thicker than epithelial day treatment groups on day 10 (P2).

Keywords: cassava leaf extract, epithelialization, *Manihot esculenta*, traumatic lesions.

Pendahuluan

Lesi traumatik merupakan salah satu lesi yang sering di jumpai pada rongga mulu. Lesi traumatic merupakan suatu luka terbuka yang melibatkan epitel. Lesi traumatik sering dibiarkan tanpa pengobatan sehingga dapat mengganggu aktivitas rongga mulut seperti mastikasi dan

berbicara. Terdapat berbagai macam penyebab lesi traumatik, diantaranya adalah prosedur kedokteran gigi yaitu trauma kimia akibat irigasi saluran akar dan prosedur anastesi lokal lidokain dimana terdapat komposisi HCl 2% di dalamnya. Proses penyembuhan lesi traumatik dapat dipercepat dengan melakukan pengobatan.

Obat-obatan yang ada dipasaran sebagian besar dapat menyebabkan efek samping yang tidak diharapkan, oleh karena itu obat herbal dapat menjadi alternatif pengobatan. Salah satu jenis obat herbal yang dapat digunakan adalah daun singkong (*Manihot esculenta*) [1]-[2].

Daun singkong (*Manihot esculenta*) memiliki kandungan gizi yang tinggi, diantaranya flavonoid dan saponin dikenal sebagai senyawa di dalam dunia tumbuhan yang memiliki peran sebagai antiinflamasi dan antibakteri. Kedua zat tersebut berperan dalam menghambat siklus aradang yaitu *siklooksigenase* dan *lipoksigenase*. Vitamin C yang terkandung dalam daun singkong sebesar 275 mg setiap 100 gr daun singkong [3]. Vitamin C dikenal sebagai nutrisi yang berguna untuk mengobati dan mencegah terjadinya penyakit sariawan atau kelainan mulut yang lainnya. Vitamin C berperan dalam pembentukan kolagen, berfungsi sebagai antioksidan, meningkatkan kerja sistem imun tubuh dan sebagai pencegah kanker [4]. Selain vitamin C, terdapat kandungan Vitamin A sebesar 11.000 SI. Vitamin A berperan dalam diferensiasi dan pergantian sel [5]. Protein dalam daun singkong berupa asam amino methionin yang nantinya akan menginduksi *cystein*. *Cystein* adalah faktor pertumbuhan yang berperan dalam sintesis kolagen. Adanya zat-zat diatas dapat memungkinkan daun singkong (*Manihot esculenta*) dapat digunakan sebagai obat herbal yang dapat meningkatkan kecepatan regenerasi epitel pada penyembuhan luka.

Penelitian sebelumnya [6] menyebutkan bahwa ekstrak daun singkong (*Manihot esculenta*) memiliki aktivitas sebagai analgesik, dengan dosis 12,8 mg/kgBB, 25,6 mg/kg bb, 51,3 mg/kg bb dan 102,6 mg/kg bb. Dosis terbaik dari penelitian tersebut adalah 25,6 mg/kg bb. Dari uraian diatas, maka diperlukan suatu penelitian tentang efek daun singkong (*Manihot esculenta*) terhadap ketebalan epitel pada lesi traumatik pada mencit BALB/C jantan.

Metode Penelitian

Jenis penelitian ini yaitu eksperimental laboratories dengan rancangan penelitian *The Post Test Only Control Group Design*. Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Fisiologi Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember, Laboratorium Histologi Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember, dan Laboratorium *Bioscience* RSGM Universitas Jember.

Sampel keseluruhan yang digunakan sebanyak 32 mencit BALB/C jantan. Sampel yang digunakan memiliki kriteria sebagai berikut: mencit galur BALB/C, jantan, berat 25-30 gr, berusia 2-3 bulan, dan mencit dalam keadaan sehat dan belum pernah digunakan untuk penelitian. Sampel sebanyak 32 ekor mencit dibagi menjadi 2 kelompok besar yaitu kelompok kontrol (K) dan perlakuan (P) masing-masing terdiri atas 16 ekor mencit. Kelompok kontrol di bagi menjadi 2 sub kelompok yaitu kontrol hari ke-7 (K1) dan kelompok kontrol hari ke-10 (K2). Kelompok Perlakuan juga dibagi menjadi 2 subkelompok yaitu perlakuan hari ke-7 (P1) dan perlakuan hari ke-10 (P2).

Tahap persiapan hewan coba yaitu mencit diadaptasikan dalam kandang kurang lebih selama 1 minggu untuk proses aklimatisasi. Proses aklimatisasi adalah proses

penyesuaian kondisi lingkungan daerah asal dengan kondisi lingkungan baru. Tahap selanjutnya pembuatan ekstrak daun singkong (*Manihot esculenta*) menggunakan kurang lebih 1 kg daun singkong segar dengan metode maserasi menggunakan ethanol.

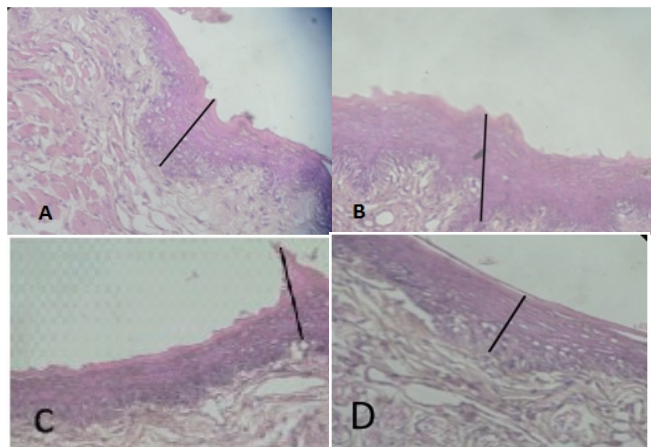
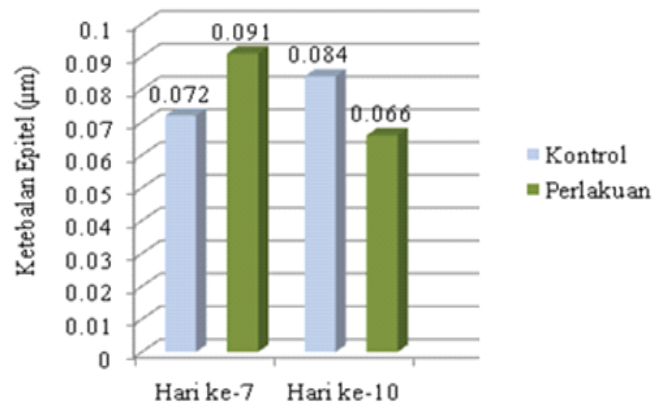
Induksi lesi traumatik menggunakan HCl 32% untuk mempercepat terbentuknya lesi traumatik. Setelah dilakukan penelitian pendahuluan, perlukaan pada mencit dilakukan dengan menempelkan HCl 32 % dengan menggunakan spon kecil pada mukosa labial mencit selama 2 detik. Mulai hari ke-1 sampai ke-10 mencit akan diberi ekstrak daun singkong menggunakan sonde lambung, diberikan sehari sekali sebanyak 0,01 ml/grbb. Pada hari ke-7 dan ke-10 diambil 8 ekor mencit dan dikorbankan, kemudian dilakukan pematangan pada daerah labial. Sampel dibuat sediaan histologi dan diukur ketebalan epitelnya menggunakan *micrometer grid*.

Data yang diperoleh dari pengukuran sampel diuji menggunakan uji non parametrik *Kruskal-Wallis* dan uji *Mann-Whitney* dengan tingkat kepercayaan 95 %.

Hasil Penelitian

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, didapatkan hasil jumlah rata-rata ketebalan epitel mencit jantan pada kelompok kontrol dan perlakuan pada hari ke-7 dan hari ke-10. Dapat dilihat di histogram di bawah ini:

Gambar 1. Grafik rata-rata ketebalan epitel mencit BALB/C



Gambar 2. Gambaran histologi perbesaran 400x dengan pewarnaan *Haemotoxilin Eosin*. (A) Gambaran histologi kelompok kontrol hari ke-7; (B) Gambaran histologi kelompok perlakuan hari ke-7; (C) Gambaran histologi kelompok kontrol hari ke-10; (D) Gambaran kelompok perlakuan hari ke-10

Data terlebih dahulu diuji normalitas menggunakan *Kolmogorov-smirnov* dan menunjukkan ($p>0,05$) sehingga dapat disimpulkan bahwa data berdistribusi normal, selanjutnya dilakukan uji homogenitas menggunakan uji *Levene test*, setelah diuji menunjukkan ($p<0,05$) artinya data tidak homogen, selanjutnya dilakukan uji beda non parametrik menggunakan *Kruskal-Wallis*, setelah di uji menunjukkan bahwa ($p<0,05$) artinya terdapat perbedaan yang signifikan antar kelompok. Selanjutnya dilakukan uji *Mann-Whitney* dengan hasil seperti pada tabel berikut:

Tabel 1. Hasil Uji *Mann-Whitney*

Kelompok	K1	K2	P1	P2
K1	-	0,156	0,021 *	343
K2	0,1560	-	0,494	0,074
P1	0,021*	0,494	-	0,006*
P2	0,343	0,074	0,006*	-

Berdasarkan hasil uji *Mann-Whitney* dapat disimpulkan bahwa kelompok perlakuan hari ke-7 (P1) berbeda signifikan lebih tebal terhadap kelompok kontrol hari ke-7 (K1), sedangkan kelompok perlakuan hari ke-7 (P1) signifikan lebih tebal terhadap kelompok perlakuan hari ke-10 (P2). Terdapat perbedaan ketebalan epitel yang tidak signifikan antara kelompok K1 dengan K2, dan kelompok K2 dengan P2.

Pembahasan

Hasil penelitian antara kelompok perlakuan P1 dan kelompok kontrol (K1) di dapatkan adanya perbedaan yang signifikan. Epitel kelompok P1 lebih tebal di bandingkan kelompok K1. Hal ini karena pemberian ekstrak daun singkong (*Manihot esculenta*) diduga dapat mempercepat epitelisasi hari ke-7, karena mengandung terdapat zat-zat seperti protein, vitamin C, vitamin A, flavonoid, triterpenoid, dan saponin. Proses penyembuhan terjadi beberapa tahap, tahap pertama yaitu tahap inflamasi yaitu infiltrasi radang akut berupa infiltrasi sel-sel radang akut ke daerah yang terluka. Fase destruktif dimana PMN dan makrofag mulai membersihkan bakteri yang mati. Sel-sel tersebut tidak hanya mampu menghancurkan bakteri dan mengeluarkan jaringan yang mengalami devitalisasi serta fibrin yang berlebihan, tetapi juga mampu merangsang pembentukan fibroblas yang melakukan sintesis struktur protein kolagen. Fase selanjutnya adalah proliferasi, sintesis kolagen sudah mulai terjadi. Fase selanjutnya reepitelisasi dan melibatkan proses mitosis dan migrasi dari sel-sel di sekitar luka [7].

Flavonoid, saponin, dan triterpenoid memiliki fungsi sebagai anti-inflamasi, antimikroba, antibakteri, dan antivirus [12].

Flavonoid berfungsi untuk membatasi pelepasan mediator inflamasi. Aktivitas antiinflamasi flavonoid dilakukan melalui penghambatan *siklooksigenase* dan *lipooksigenase* sehingga terjadi pembatasan jumlah sel inflamasi yang bermigrasi ke jaringan perlukaan. Selanjutnya reaksi inflamasi akan berlangsung lebih singkat dan kemampuan proliferasi dari TGF- β tidak terhambat, sehingga proses proliferasi dapat segera terjadi. Pada penelitian sebelumnya efek daun singkong (*Manihot esculenta*) terbukti bahwa kemampuan analgesik daun singkong setara dengan obat analgesik [13]-[6].

Aktivitas flavonoid yang lain adalah dapat mempercepat proses penyembuhan luka didukung juga oleh mekanisme antioksidan dalam melakukan penghambatan aktivitas radikal bebas. Flavonoid dapat pula mencegah aktivitas radikal bebas yang memperlambat proses inflamasi dengan berbagai mekanisme yang antara lain dengan menstabilkan komponen dari radikal bebas tersebut. Reaktivitas yang tinggi dari komponen hidroksil *flavonoid* mengakibatkan radikal bebas menjadi tidak aktif sehingga aktivasi terhadap mediator inflamasi oleh radikal bebas dapat dihambat [13]. Penelitian daun singkong (*Manihot esculenta*) tentang aktivitas antioksidan juga sudah terbukti memiliki efek antioksidan [15]. Jika proses inflamasi dapat berlangsung lebih singkat maka penyembuhan jaringan yaitu reepitelisasi akan segera tercapai lebih dini [14].

Saponin juga memiliki peranan khusus pada proses epitelisasi. Saponin dapat meningkatkan fibronectin, kemudian gumpalan fibrin yang terbentuk akan menjadi dasar dalam reepitelisasi pada jaringan. Maka dari itu bila gumpalan fibrin cepat terbentuk, maka fibroblas akan segera berproliferasi ke area luka untuk segera mengadakan pemulihan jaringan [13]. Selain itu saponin memiliki sifat antimikroba, sehingga infeksi dapat ditekan, karena luka yang terinfeksi dapat menunda atau menghambat laju reepitelisasi [12]. Saponin juga memiliki peran meningkatkan respon sel imun [16]. Hal ini juga dibuktikan oleh penelitian sebelumnya bahwa saponin memiliki efek pada penyembuhan luka, dan terbukti dapat meningkatkan pembentukan pembuluh darah [17].

Vitamin C berperan dalam sintesis kolagen, proteoglikan, dan komponen organik lain dalam intrasellular matrik jaringan seperti tulang, kulit, dinding kapiler, dan jaringan ikat yang lain [10]. Hal ini juga dibuktikan oleh penelitian sebelumnya bahwa bahwa terjadi peningkatan ketebalan epitel gingival pada tikus wistar jantan [11]. Vitamin C akan mengaktifkan katalisator ion Fe^{2+} dan ion Cu^{+} yang akan mengaktifkan enzim-enzim pada proses hidroksilasi asam amino prolin dan lisin menjadi hidroksiprolin dan hidroksilisin. Reaksi hidroksilasi ini diperlukan untuk mengadakan perlekatan silang (*cross linking*) dan tripel helix pada jaringan sehingga didapat struktur jaringan yang sehat dan kuat [4]. Jika proses proliferasi yang meliputi sintesis kolagen dapat tercapai, maka proses epitelisasi akan berlangsung lebih cepat.

Protein di dalam daun singkong berupa *methionin* yang nantinya akan menginduksi ko-faktor dari sintesis kolagen dan dibuktikan pada penelitian sebelumnya bahwa pemberian protein dapat mempercepat penyembuhan luka [8]-[9]. Vitamin A yang berupa asam retinoat

memiliki peranan dalam differensiasi sel, sehingga vitamin A mengatur pada proses reepitelisasi pada mitosis sel-sel di sekitar luka [10].

Kelompok kontrol hari ke-10 (K2) dan perlakuan hari ke-10 (P2) setelah dilakukan analisis data menunjukkan tidak ada beda yang signifikan. Hal ini karena kelompok P2 sudah mengalami masa maturasi. Dalam fase maturasi disebutkan setelah matriks ekstraseluler yang banyak mengandung fibronektin diletakkan, proses reorganisasi pun dimulai. Pada tahap ini serat kolagen yang tidak beraturan dihancurkan dan diganti dengan serat kolagen baru yang berorientasi lebih baik dalam menahan *tensile force* luka. Metabolisme luka menurun dan diikuti dengan penurunan vaskularisasi. Kontraksi luka meningkat karena sehingga mengurangi ukuran luka [19].

Demikian juga pada kelompok K1 dan K2. Kelompok kontrol hari ke-7 (K1) dan kontrol hari ke-10 (K2), setelah diuji tidak terdapat perbedaan yang signifikan. Kelompok K1 masih mengalami inflamasi, sedangkan kelompok K2 mengalami proses epitelisasi namun proses inflamasi sudah berakhir.

Kelompok perlakuan hari ke-7 (P1) dan perlakuan hari ke-10 (P2) mengalami perbedaan ketebalan epitel yang signifikan. Epitel kelompok P1 lebih tebal daripada kelompok P2, hal ini disebabkan karena pada kelompok P1 terjadi proses penyembuhan yang didukung dari kandungan gizi dari daun singkong. Flavonoid dan saponin yang berperan pada proses inflamasi, protein dan vitamin C yang berperan pada proses proliferasi, dan vitamin A yang berperan pada proses reepitelisasi, kemudian fase maturasi akan berjalan lebih dini. Sedangkan pada kelompok P2 epitel menjadi lebih tipis karena mengalami fase maturasi yang lebih lama. Pada fase maturasi disebutkan setelah matriks ekstraseluler yang banyak mengandung fibronektin diletakkan, proses reorganisasi dimulai. Pada tahap ini serat kolagen yang tidak beraturan dihancurkan dan diganti dengan serat kolagen baru yang berorientasi lebih baik dalam menahan *tensile force* luka. Metabolisme luka menurun dan diikuti dengan penurunan vaskularisasi. Kontraksi luka meningkat karena sehingga mengurangi ukuran luka. Hal inilah yang menyebabkan epitel pada kelompok P2 menjadi lebih tipis

Kesimpulan dan Saran

Berdasarkan hasil penelitian di atas dapat disimpulkan bahwa ekstrak daun singkong (*Manihot esculenta*) terbukti dapat meningkatkan ketebalan epitel lesi traumatik mencit BALB/C jantan yaitu pada kelompok perlakuan hari ke-7 (P1). Ketebalan epitel pada kelompok yang diberi ekstrak daun singkong (*Manihot esculenta*) hari ke-7 (P1) lebih tebal daripada epitel kelompok perlakuan hari ke-10 (P2).

Saran yang dapat diberikan berdasarkan penelitian di atas adalah perlu dilakukan penelitian lebih lanjut tentang berbagai dosis yang lain ekstrak daun singkong (*Manihot esculenta*) selain dosis yang digunakan dalam penelitian ini, dan penelitian lebih lanjut mengenai efek antiinflamasi,

antibakteri, antivirus, dan anti-jamur dari ekstrak Daun singkong (*Manihot esculenta*).

Ucapan Terima Kasih

Penulis mengucapkan terimakasih kepada drg. Yani Corvianindya Rahayu, M.KG, dan drg. Dwi Merry C, M.Kes selaku dosen penguji dimana semuanya sudah banyak membantu dan memberi masukan untuk penulis selama penelitian dan penyusunan skripsi.

Daftar Pustaka

- [1] Manson, J.D dan B. M. Eley., *Buku Ajar Periodonti Edisi 2*. Terjemahan oleh Anastasia S dari Outline of Periodontics. Jakarta: Hipokrates (1993)
- [2] Lewis, M. A. O dan P. J Lamey., *Tinjauan Klinis Penyakit Mulut*. Terjemahan Elly Wiriawan. Jakarta :Widya Medika (1998).
- [3] Rukmana, Rahmat. *Ubi Kayu Budi Daya dan Pascapanen*. Yogyakarta : Kanisius. (1997).
- [4] Yendriwati, *Kebutuhan Vitamin C dan Pengaruhnya terhadap Kesehatan Tubuh dan Rongga Mulut*. Dentika Dental Journal, Vol 11, No. 1 : (2006) 78-83.
- [5] Murray, Granner, Rodwell, *Biokimia Harper*. Edisi 25. Jakarta : Penerbit Buku kedokteran EGC. (2006).
- [6] Desrini, Dayi, Miladiyah, *Analgesic activity of Ethanolic extract of Manihot esculenta Crantz leaves in mice*. <http://www.univmed.org>. Universa Medicina. Vol. 30 No. 1 (2011).
- [7] Morrison, Moya J, *Manajemen Luka*. Jakarta : Penerbit Buku Kedokteran EGC (2003).
- [8] Shai, Avid dan Howard I. Maibach, *Wound Healing and Ulcers of the Skin*. Heidelberg : Springer Science and Business Media (2005).
- [9] Shukla, A, *Differential Expression of Proteins during Healing Of Cutaneous Wounds in Experimental Normal and Chronic Models*. Biochemichal Biophys Res Comm. 244 (2): 434-9 (1998).
- [10] MacKay, Douglas and alan L. Miller, *Nutritional Support for Wound Healing*. Alternative Reviews. Vol 8 No.4 (2003).
- [11] Astuti, Dewi Indri, *Gambaran Mikroskopis Ketebalan Epitel Gingiva Setelah Pemberian Vitamin C Pada Proses Penyembuhan Luka Pada Tikus Wistar Janta*. Tidak diterbitkan. Skripsi. Jember : Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember. (2005).
- [12] Robinson, Trevor, *Kandungan Organik Tumbuhan Tinggi*. Alih bahasa oleh Kokasih Padmawinata. Bandung : ITB. (1995).
- [13] Indraswary, Recita, *Efek Konsentrasi Ekstrak Buah Adas (Foeniculum vulgare Mill) Topikal Pada Epitelisasi Penyembuhan Luka Gingiva Labial Tikus Sprague Dwaley In Vivo*. Majalah Universitas Sultan Agung. (2011).
- [14] Sulistiawati, I Dewa Ayu Nuraini, *Pemberian Ekstrak Daun Lidah Buaya (Aloe Vera) Konsentrasi 75% Lebih Menurunkan Jumlah Makrofag daripada Konsentrasi 50% dan 25 % pada Radang Mukosa Mulut Tikus*

- Putih Jantan*. Tesis. Denpasar : Program Magister, Program Studi Ilmu Biomedik Program Pascasarjana Universitas. (2011).
- [15] Isnaeni, Rachmatia Fadhillah, *Uji Daya Antioksidan Ekstrak Etanol Daun Ubi Kayu (Manihot esculenta, Crantz) Pada Tikus Putih (Rattus norvegicus) Galur Wistar Janta Yang Diinduksi CCl4*. Intisari Skripsi. Universitas Islam Indonesia.. (2011).
- [16] Hoffmann, David, *Medical Herbalism : The science and Praticce Of Herbal Medicine*. Vermont : Healing Arts Press. (2003).
- [17] Morisaki *et al*, *Mechanism of Angiogenic Effects of Saponin from Gingseng Radix Rubra in Human Umbilical Vein Endothelial Cells*. Br J Pharmacol. 115 (7):1188-93. (1995).
- [18] Carranza, FA, *The Gingiva in Caranza's Clinical Periodontology 10th Edition*. Philadelphia : W. B Saunders Co.(2006).
- [19] Peterson *et al*, *Oral and Maxillofacial Surgery* (4th Ed). Missouri : Mosby. (2003).

