

Viabilitas Kultur Sel Fibroblas pada Tiga Macam Susu Sapi UHT Sebagai Media Simpan Gigi Avulsi (*In Vitro*)

Delvi Fitriani

Departemen Ilmu Material Kedokteran Gigi Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Brawijaya

Endang Asmaningsih

Laboratorium Histologi dan Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya

Muhammad Luqman Rahardian

Komando Pembinaan Doktrin dan Pendidikan TNI AL, Kodiklatal Surabaya

Abstrak

Latar Belakang: *Avulsi* didefinisikan sebagai keluarnya seluruh gigi dari soket akibat trauma. Penanganan kasus avulsi dengan melakukan replantasi secepatnya, jika tidak dapat dilakukan sebaiknya gigi avulsi disimpan dalam media penyimpanan untuk menjaga viabilitas sel ligamen periodontal. **Tujuan:** untuk mengetahui beda efektifitas tiga macam susu sapi UHT sebagai media simpan gigi avulsi dalam menjaga viabilitas sel fibroblas. **Metoda :** Jenis penelitian ini adalah eksperimental *in vitro* dengan rancangan *Randomized Post Test Only Control Group Design*. Sampel yang digunakan adalah kultur sel fibroblas, dibagi 3 kelompok perlakuan dan kelompok kontrol. Sampel diinkubasi selama 24 jam kemudian media kultur diganti dengan media simpan yaitu susu sapi UHT dengan pewarna dan perasa (kelompok I), susu sapi UHT tanpa pewarna dan perasa (kelompok II), susu sapi UHT tanpa merek (kelompok III) dan media Eagle's (kontrol) . Jumlah sel yang hidup dalam *microplate* dihitung dengan *ELISA reader* menggunakan MTT Assay dan analisis statistik dengan Anova dan LSD. **Hasil:** Didapatkan perbedaan bermakna ($p < 0,005$) pada kelompok I (95,93%), kelompok II (93,45%) dan kelompok III (79,24%) dengan kelompok kontrol. **Simpulan:** Susu sapi UHT dengan pewarna dan perasa merupakan media simpan gigi avulsi paling efektif dalam mempertahankan viabilitas sel fibroblas dari tiga jenis susu sapi UHT.

Kata Kunci : Avulsi, Susu Sapi UHT, Sel Fibroblas.

Korespondensi:

Delvi Fitriani

Departemen Ilmu Material
Kedokteran Gigi Fakultas
Kedokteran Gigi Universitas
Brawijaya

Fibroblast Culture Cell Viability of Three Variant UHT Cow's Milk As Storage Media for Avulsed Tooth (in Vitro)

Abstract

Background: Avulsion is defined by tooth out of its socket because of trauma. Immediately replantation is the best treatment of avulsed tooth but if it can't be done the tooth should be stored in a media to keep viability of periodontal ligament cell. **Purpose:** To determine effectivity differences of three variant of UHT cow milk as storage media for avulsed tooth in preserving living fibroblast cell. **Method:** This study was experimental research (*in vitro*) with Randomized Post Test Only Control Group Design. Sample using fibroblast culture cell. First, sample is incubated for 24 hours then divided into three group, those are UHT cow's milk with dye and flavour ingredient (group I), plain UHT cow's milk (group II), unbranded UHT cow's milk (group III) and Eagle's medium (control). Living fibroblast culture cell in microplate is counted by ELISA reader using MTT Assay and statistically measured with Anova and LSD. **Results:** There were significant differences ($p < 0.005$) among group I (95,93%), group II (93,47%) and group III (79,24%) compare with control group. **Conclusions:** UHT cow's milk with dye and flavour ingredient is the most effective storage media for avulsed tooth in preserving living fibroblast cell among treatment group.

Keyword : Avulsion, UHT Cow's Milk , Fibroblast Cell

Pendahuluan

Cedera traumatik gigi meliputi patahnya enamel gigi, dentin dengan ada tidaknya keterlibatan pulpa, fraktur akar, fraktur mahkota, perubahan letak gigi dan *avulsi*.¹ *Avulsi* adalah bentuk cedera traumatik gigi kelas lima yang didefinisikan sebagai keluarnya seluruh gigi dari soket akibat trauma. Pemeriksaan klinik dan gambaran foto rontgen, tidak terdapat gigi di dalam soket.²

Tulang alveolar, sementum, ligamen periodontal, gingiva, dan pulpa akan

mengalami kerusakan pada saat gigi secara total keluar dari soketnya³. Gigi yang tercabut dari soketnya akibat trauma menyebabkan ligamen periodontal terputus dan suplai darah ke jaringan pulpa terputus, sehingga pulpa gigi mengalami nekrosis dan jaringan periodonsium rusak parah.⁴

Rusaknya ligamen periodontal berarti juga rusaknya sel-sel yang menyusun ligamen tersebut yang sebagian besar terdiri atas berbagai macam sel. Elemen seluler dari ligamen periodontal adalah fibroblas, sel endotelial, sementoblas, osteoblas, osteoklas, makrofag, dan sisa-sisa sel

epithelial yang disebut sebagai sisa-sisa epitel mallassez atau sisa sel-sel epithelial.⁵

Viabilitas sel fibroblas pada gigi yang avulsi menentukan keberhasilan dalam tindakan replantasi yaitu memasukkan atau menanamkan kembali gigi yang telah lepas dari soketnya. Replantasi gigi *avulsi* dilakukan secepatnya untuk mempertahankan integritas fungsi dan estetis gigi yang mengalami avulsi, selanjutnya dilakukan stabilisasi gigi tersebut pada posisi yang benar untuk mengoptimalkan penyembuhan ligamen periodontal dan suplai neurovaskular. Salah satu faktor penting untuk keberhasilan penyembuhan ligamen periodontal pada gigi yang direplantasi adalah durasi *extra-alveolar* karena semakin lama gigi berada di luar rongga mulut semakin kecil presentase viabilitas ligamen periodontalnya.⁶ Jika tindakan replantasi tidak dapat dilakukan secepatnya sebaiknya gigi yang avulsi disimpan dalam suatu media penyimpanan. Media ini akan menjaga supaya sel ligamen periodontal tidak cepat mati (*viable*). Syarat media untuk menyimpan gigi avulsi antara lain *Potential Hydrogenionic* (pH), yang berkisar 7,2 - 7,4 dan 290 - 330 mOsm/kg untuk osmolalitas dari media tersebut. Macam-macam media penyimpanan antara lain *Hank Balanced Salt Solution*, susu, minuman isotonik, saliva, cairan lensa kontak, putih telur, emdogain, viaspan, dan eagle's medium.⁷

Pada era 80an, Blomlof dan kawan-kawan merekomendasikan susu sapi komersial sebagai tempat penyimpanan sementara gigi *avulsi*. Keuntungan susu sebagai cairan preservasi adalah susu menyerupai isotonik dan relatif bebas dari kontaminasi bakteri. Peneliti lain mengutarakan terdapat metabolisme aktif dan sel hidup yang disekresikan oleh colostrum manusia.⁸

Pada era 90an, Trope and Friedman menyatakan bahwa susu secara signifikan lebih baik daripada media lain ditinjau dari

segi sifat fisiologisnya, termasuk pH dan osmolalitasnya yang sangat kompatibel dengan lingkungan hidup sel dari ligamen periodontal.⁹ Data ini mengindikasikan bahwa susu menjadi sebuah tempat penyimpanan sementara yang efektif untuk menjaga viabilitas fibroblast ligamen periodontal yang melekat pada akar gigi avulsi. Susu juga mudah terjangkau masyarakat karena banyak terdapat di pasaran.

Berdasarkan latar belakang di atas, penelitian ini dibuat untuk mengetahui perbedaan viabilitas sel kultur fibroblas dalam tiga macam susu sapi sebagai media preservasi gigi avulsi.

Metode penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental *in vitro Randomized Post Test Only Group Design*, yaitu kelompok kontrol dan perlakuan. Kelompok kontrol menggunakan media simpan larutan Eagle's sedangkan perlakuan dibagi menjadi 3 kelompok yaitu, Kelompok I (susu sapi UHT dengan rasa dan pewarna), kelompok II (susu sapi UHT tanpa rasa dan pewarna), kelompok III (susu sapi UHT tanpa merk). Pembagian kelompok adalah secara random dan diambil datanya setelah dilakukan perlakuan.

Sampel yang digunakan adalah sel fibroblas sebagai model *in vitro* sel fibroblas ligament periodontal yang berasal dari *pig kidney* yang *inactive* kemudian dilakukan proses inkubasi dan pembiakan. Sel fibroblas ini didapat dari PUSVETMA (Pusat Veterinary Farma) Surabaya. Jumlah sampel diperoleh dari rumus Federer.¹⁰ Sehingga besar sampel yang diperoleh minimal adalah 6. Sampel dalam penelitian ini menggunakan sel fibroblas (*inactive*) yang telah dikultur dan diinkubasi selama 24 jam dengan kriteria inklusi: a. Sel fibroblas yang berasal dari *pig kidney*; b. Sel fibroblas yang hidup dengan jumlah 80% yang telah dikultur selama 24 jam.

Kriteria Eksklusi : a. Sel fibroblas yang mengalami kontaminasi; b. Sel fibroblas yang telah mengalami differensiasi selama inkubasi.

Variabel Penelitian: a. Variabel Bebas : Susu sapi UHT (*Ultra Heat Temperature*) yaitu susu sapi dengan rasa dan pewarna (Susu Ultra), susu sapi tanpa rasa dan pewarna (susu Bear Brand) dan susu tanpa merk; b. Variabel Terikat : sel kultur fibroblas yang vital.

Penelitian dilakukan di laboratoriuin Pusat Veterinary Farma (PUSVETMA) Surabaya pada tgl 10 Juni 2013.

Sel fibroblas yang telah dirontokkan dengan VT (*Vetsin Trypsin*) diambil dengan *micropipet* dari botol penyimpanan kemudian dipindahkan ke dalam *microplate* (96-wellplate) yang sudah diberi media MEM (*Minimum Essential Medium Eagle's*) dan ditambahkan FBS (*Fetal Bovine Serum*). Setelah itu *microplate* diselotip dan dimasukkan ke dalam inkubator CO₂ selama 24 jam.

Setelah diinkubasi selama 24 jam dalam inkubator CO₂, MEM + FBS diambil menggunakan *micropipet*, tinggalah sel fibroblast dalam *microplate* untuk kemudian dibilas menggunakan PBS (*Phosphate Buffered Salin*) untuk menghilangkan sel-sel yang rusak. Setelah itu memasukkan media-media simpan yaitu susu sapi UHT ke dalam *microplate* masing-masing 8 kolom ke bawah pada setiap jenis susu sapi UHT sebanyak 100 mikroliter. Kemudian *microplate* kembali disimpan di dalam inkubator selama 3 jam.¹¹

Setelah itu *microplate* dikeluarkan dan larutan susu diambil dengan *micropipet* kemudian *microplate* dibilas menggunakan PBS untuk menghilangkan sel-sel yang rusak. *Microplate* kemudian dibalik untuk membuang PBS. Setelah itu dilakukan penambahan larutan MTT-Assay dengan menggunakan *micropipet* sebanyak 10 mikroliter dan diinkubasi selama 2 jam. Kemudian ditambahkan DMSO (*Dimethyl*

Sulfate Oxide) 10 mikroliter setelah durasi inkubasi berakhir untuk menghentikan kerja MTT. *Microplate* yang telah ditambahkan DMSO kemudian diletakkan di atas Rotomix untuk meratakan larutan dengan cara mengocok secara perlahan selama kurang lebih 5 menit. Setelah semua perlakuan di atas, *microplate* ditempatkan ke dalam alat ELISA reader.

Data sel fibroblas yang vital dilakukan dengan perhitungan presentase. Kemudian masing-masing kelompok dilihat distribusi datanya dengan uji *Shapiro Wilk*. Sedangkan uji signifikan jumlah sel fibroblas antar

Tabel 1. Rerata Jumlah sel Fibroblas Vital

Kelompok	Jumlah Sel	%
Kontrol	0.30713	99,45 ± 1,64855%.
I	0.29463	95,93 ± 2,44887%.
II	0.28700	93,45 ± 1,720465%
III	0.24338	79,243±1,945645%.

Tabel 2. Uji Saphiro Wilk

Kelompok	Signifikansi	Distribusi
Kontrol	0.294	normal
I	0.711	normal
II	0.725	normal
III	0.662	normal

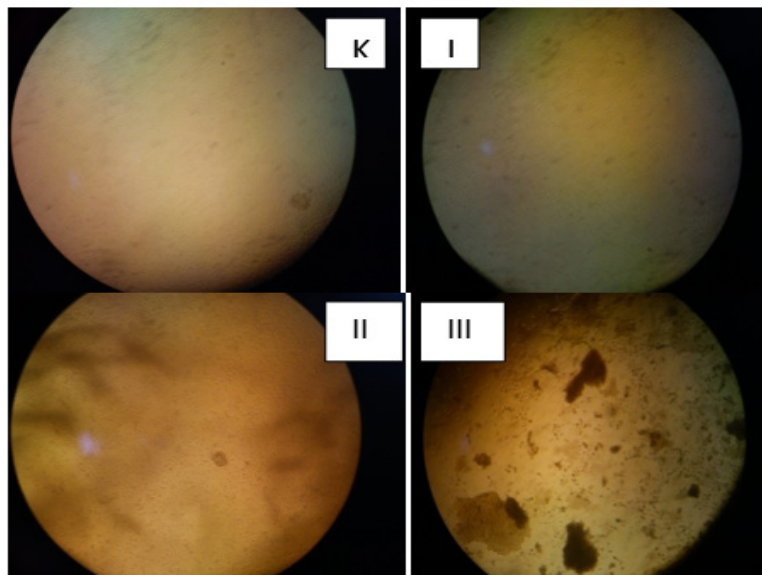
Tabel 3. Uji ANOVA

SK	JK	db	KT	F _{hitung}	Sig.
Between Groups	0.0184	3	0.0061	15.8585	0.0000
Within Groups	0.0108	28	0.0004		
Total	0.0293	31			

Tabel 4. Uji LSD Untuk Perlakuan Terhadap Banyaknya Sel Fibroblas Vital

Kelompok	Nilai	Notasi
Kontrol	0.30713	b
I	0.29463	a
II	0.28700	a
III	0.24338	a

Keterangan : angka yang diikuti dengan notasi yang sama berarti tidak berbeda nyata



Gambar 1. Tampilan histologi (40x) pada (K) kontrol media (Eagle's medium), (I) media susu sapi UHT dengan pewarna dan perasa (Susu Ultra), (II) media susu sapi UHT tanpa pewarna dan perasa (susu Bear Brand), (III) media susu sapi UHT tanpa merek.

kelompok kontrol dan perlakuan dilakukan dengan uji Anova, yang kemudian dilanjutkan dengan uji LSD untuk melihat distribusi perbedaan dari setiap pasang kelompok. Pada tabel 2 tersebut menunjukkan signifikansi dari uji Shapiro Wilk lebih besar dari 0.05 (α), sehingga diperoleh data banyaknya sel hidup pada setiap perlakuan yang diperoleh memiliki sebaran (distribusi) normal. Setelah itu dilakukan Uji *One Way* ANOVA.

Hasil pengujian menggunakan *One Way* ANOVA menunjukkan bahwa perlakuan memberikan pengaruh yang berbeda nyata terhadap banyaknya sel yang masih hidup. Hal ini berdasarkan signifikansi/Sig.(0,0000) pada tabel 3 tersebut lebih kecil daripada α (0.05) sehingga H_0 ditolak ($p < 0.05$) dan dapat disimpulkan bahwa perlakuan memberikan pengaruh yang berbeda nyata terhadap banyaknya sel yang masih hidup. Langkah selanjutnya adalah melakukan perbandingan untuk mengetahui pasangan perlakuan manakah yang memberikan pengaruh yang berbeda nyata pada banyaknya sel yang masih hidup, dengan melakukan Uji LSD. Berdasarkan uji LSD pada tabel 4 tersebut

dapat diketahui bahwa rerata jumlah sel yang masih hidup pada kelompok perlakuan susu sapi UHT tanpa merek berbeda nyata dengan rerata jumlah sel pada perlakuan susu sapi UHT tanpa pewarna dan perasa, susu sapi UHT dengan pewarna dan perasa dan kelompok kontrol. Sedangkan rerata banyak sel pada perlakuan susu sapi UHT bermerek tanpa pewarna dan perasa tidak berbeda nyata dengan rata-rata banyak sel pada perlakuan susu sapi UHT bermerek dengan perasa dan pewarna dan kontrol sel.

Pembahasan

Gigi Avulsi menurut Tsukiboshi (2000) adalah lepasnya gigi secara utuh dari tulang alveolar dengan hilangnya suplai aliran darah pulpa secara menyeluruh.¹ Trauma ini menyebabkan hilangnya perlekatan dengan ligamen periodontal yang terdapat di soket alveolaris. Perawatan yang dapat dijadikan pilihan adalah dengan mereplantasi gigi kembali ke dalam soket. Viabilitas sel ligamen periodontal yang ada di akar sangat menentukan dalam keberhasilan replantasi gigi. Untuk mempertahankan vitalitas sel

ligamen periodontal di luar soket, dibutuhkan media penyimpanan yang sesuai¹².

Penelitian ini menggunakan tiga macam susu sapi UHT (*Ultra Heat Temperature*) yang beredar di pasaran kota Malang sebagai media dalam penyimpanan gigi avulsi berdasarkan sifat osmolalitas yang baik, isotonik dan mudah diperoleh. Selain itu susu sapi juga memiliki kandungan tambahan yang menyerupai media HBSS (*Hank's Balanced Salt Solution*) yaitu adanya zat gula dan zat tambahan seperti kolustrum yang diharapkan dapat menjadi media yang sesuai dalam penyimpanan gigi avulsi.

Untuk mengetahui efektivitas susu UHT sebagai media penyimpanan gigi avulsi, digunakan uji vitalitas sel fibroblas dalam media simpan yang akan dibandingkan dengan media simpan standar yaitu larutan Eagle's. Sel fibroblas yang digunakan berasal dari *pig kidney* yang telah dikultur sebagai model in vitro sel fibroblas yang terdapat pada ligamen periodontal. Uji vitalitas sel fibroblas merupakan uji kuantitatif dengan menghitung jumlah sel fibroblas vital yang dibuat dalam persentase untuk menyatakan vitalitas sel fibroblas pasca perlakuan.¹³

Sebagai kelompok kontrol digunakan sel fibroblas yang telah dikultur menggunakan media Eagles yang ditambahkan dengan *fetal bovine serum* (FBS) untuk memberi nutrisi sewaktu inkubasi. Kelompok perlakuan yaitu sel fibroblast yang direndam selama tiga jam pada tiga macam susu sapi UHT yang beredar di Malang. Kelompok I direndam dalam susu sapi UHT dengan pewarna dan perasa. Kelompok II direndam dalam susu sapi UHT tanpa pewarna dan perasa. Kelompok III direndam dalam susu sapi UHT tanpa merek.

Penghitungan jumlah sel dengan menggunakan bahan MTT (*Methylthiazol Tetrazolium*) yang peka terhadap bahan sisa metabolisme sel yang hidup. Reaksi MTT berbanding lurus dengan jumlah sel fibroblas yang masih vital. Prinsip kerja MTT

adalah dengan terjadinya reduksi garam kuning *tetrazolium* oleh sistem reduktase dimana *tetrazolium* ini termasuk dalam rantai respirasi dalam mitokondria sel yang hidup yang membentuk kristal formazan berwarna ungu dan tidak larut di dalam air. Penambahan *reagen stopper* DMSO (*Dimethyl Sulfate Oxide*) akan melarutkan kristal berwarna ungu yang kemudian diukur menggunakan ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) reader. Intensitas warna ungu yang terbentuk berbanding lurus dengan jumlah sel yang hidup. Sehingga jika intensitas warna ungu semakin tinggi maka berarti jumlah sel hidup semakin banyak.

Susu UHT dengan pewarna dan perasa memiliki kemampuan mempertahankan persentase sel fibroblas vital dalam perendaman 3 jam sebesar $95,93 \pm 2,44887\%$. Persentase tersebut lebih tinggi dari susu sapi UHT tanpa pewarna dan perasa, yaitu sebesar $93,447 \pm 1,720465\%$ dengan perbedaan selisih yang bermakna ($\text{sig} < 0,05$). Sedangkan apabila dibandingkan dengan susu UHT dengan pewarna dan perasa dan susu UHT tanpa pewarna dan perasa, susu sapi UHT tanpa merek memiliki kemampuan yang lebih rendah dalam mempertahankan persentase vitalitas sel fibroblas dengan perbedaan selisih yang bermakna ($\text{sig} < 0,05$). Pada susu sapi UHT tanpa merek, diperoleh persentase sel fibroblas sebesar $79,243 \pm 1,945645\%$. Dengan adanya perbedaan signifikan antara kelompok susu sapi UHT dengan rasa dan pewarna dengan susu UHT tanpa rasa dan pewarna yang lebih tinggi dari susu UHT tanpa merek jika dibandingkan dengan media Eagles, maka diperoleh simpulan bahwa susu sapi UHT dengan rasa dan pewarna dan susu sapi UHT tanpa rasa dan pewarna adalah media simpan gigi avulsi yang efektif dalam menjaga vitalitas sel fibroblas.

Media susu ini selain memiliki osmolaritas yang mirip dengan sel tubuh yaitu 308 mOsm/L juga memiliki pH yang

seimbang. Osmolaritas menyatakan jumlah partikel zat yang terlarut per liter larutan. Sel tubuh dapat tumbuh pada kisaran 230-400 mOsm/L.¹³ Susu juga memiliki kelebihan lain yaitu memenuhi kebutuhan glukosa dari metabolisme sel. Oleh karena itu penggunaan susu ini baik untuk penyimpanan jangka panjang yaitu tidak lebih dari 6 jam sebelum gigi direplantasi.⁹

Pada susu UHT yang diujikan tidak didapatkan keterangan mengenai pH dan osmolaritasnya, tetapi dengan kondisi seperti cairan ekstraseluler menjadikan larutan ini dapat menciptakan suasana konsentrasi ekstrasel yang setara dengan konsentrasi di dalam sitoplasma sel. Dengan meletakkan sel pada larutan isotonis yang mempunyai suasana hampir sama dengan keadaan ekstraseluler akan membuat tingkat perpindahan zat ke luar dan ke dalam sel akan berada pada tingkat yang sama dan seimbang sehingga sel tidak rusak. Sel juga mendapatkan glukosa sebagai bahan metabolisme intrasel sehingga dapat memberi kesempatan sel untuk tetap vital dalam waktu perendaman 3 jam tersebut.

Adanya perbedaan rerata persentase vitalitas sel fibroblas yang lebih tinggi pada susu UHT dengan rasa dan pewarna dan susu UHT tanpa rasa dan pewarna dibandingkan dengan susu UHT tanpa merek diduga karena aspek higienis pengemasan yang kurang baik jika dibandingkan dengan susu UHT komersial sehingga mudah terpapar bakteri dan mikroba. Patut diduga adanya pengenceran atau tambahan air pada susu sapi UHT tak bermerek untuk mendapatkan untung. Hal ini akan menyebabkan faktor osmolaritas dan pH larutan yang tidak bisa mengakomodasi lingkungan ekstrasel dengan baik.

Menurut Blomlof (1980), faktor yang utama dalam mempertahankan vitalitas sel fibroblas adalah osmolaritas dari media penyimpanan.¹⁴ Hal ini didukung dengan penelitian yang dilakukan Andreasen yang

mengemukakan bahwa pada larutan salin isotonik dan saliva memiliki kemampuan menurunkan angka resorpsi akar gigi paska avulsi meskipun memiliki komposisi kimia yang berbeda satu sama lain. Sehingga dapat disimpulkan bahwa vitalitas sel fibroblas lebih dipengaruhi oleh faktor osmolaritas media penyimpanannya daripada komposisi kimia media tersebut. Untuk mendapat persentase sel fibroblas vital lebih banyak, dapat dilakukan dengan mempersingkat waktu perendaman dalam media tersebut.¹⁵

Dari masing-masing macam susu sapi UHT apabila dibandingkan dengan uji LSD, diperoleh bahwa jumlah persentase sel yang vital pada susu UHT dengan pewarna dan perasa tidak memiliki beda selisih yang signifikan dengan susu UHT tanpa pewarna dan perasa sehingga dapat dikatakan memiliki kemampuan yang sama dalam mempertahankan persentase vitalitas sel fibroblas. Pada susu UHT dengan pewarna, zat pewarna yang digunakan adalah jenis berlian cl 42090 yang telah terdaftar resmi sebagai zat pewarna makanan yang aman sehingga tidak merusak sel. Dengan begitu, maka konsep osmolaritas dan isotonik tetap terjaga¹⁶.

Pada penyimpanan gigi avulsi dengan media yang tepat, maka diharapkan dapat mendekati penyembuhan optimal paska replantasi gigi avulsi. Penyembuhan yang terjadi paska replantasi gigi avulsi menentukan prognosa jangka panjang replantasi gigi avulsi¹⁴.

Simpulan

1. Susu sapi UHT dengan pewarna dan perasa merupakan media simpan gigi avulsi paling efektif dalam mempertahankan viabilitas sel fibroblas secara invitro.
2. Susu sapi UHT tanpa rasa dan pewarna memiliki nilai viabilitas sel fibroblas yang berbeda tidak signifikan dibanding dengan susu sapi UHT dengan rasa dan

pewarna secara in vitro.

3. Susu sapi UHT tanpa merek memiliki nilai viabilitas sel fibroblas terendah sebagai media simpan gigi avulsi diantara semua jenis susu sapi UHT secara in vitro.

Daftar pustaka

1. Tsukiboshi, M. 2000. Autotransplantation of teeth: requirements for predictable success. *Dent Traumatol* ;18:159-80
2. Dalimunthe, T. 2003. Replantasi gigi depan sulung yang avulsi. *Dentika Dent J. 8* : 249-4
3. Andreasen, JO. Andreasen, FM. 2000. Essentials of Traumatic Injuries to the Teeth. 2nd ed. Copenhagen, Denmark: *Munksgaard and Mosby*;9-154.
4. Ram, D. Cohenca, N. 2004. Treatment for avulsed permanent teeth. Therapeutic protocols for avulsed permanent teeth : review and clinical update. *Pediatr Dent J.26* : 251-5
5. Caranza, F.A. 2002. Clinical Periodontology. 9th Edition. *Philadelphia: W.B. Saunders Company*
6. Jacobsen, I. Andreasen, JO. 2003. Traumatic injuries-examination, diagnosis and immediate care. In : Koch G, Poulsen S, eds. *Pediatric dentistry-a clinical approach*. 2nd ed. Copenhagen : Blackwell Munksgaard : 352, 353, 374-5.
7. Lehninger, AL. Nelson, DL. Cox, MM. 1995. Princpios de bioquimica. Sao Paulo : *Sarvier Editora*. 839 p.
8. Crago, SS. Prince, ST, Pretlow, TG. 1979. Humanco lostral cells: I. Separation and characterization. *Clin Exp Immuno*318 :585-89
9. Trope, M. Friedman, S. 1992. Periodontal healing of replanted dog teeth stored in ViaSpanr, milk and Hank's balanced salt solution. *Endod Dent Traumatol, 8*: 183-88.
10. Federer W. Statistics and society: data collection and interpretation.2nd.*New York:Marcel Dekker;1991*.
11. Souza BD, Lückemeyer DD, Reyes-Carmona JF, Felipe WT,Simões CM,Felipe MC. Viability of human periodontal ligamentfibroblasts in milk, Hank's balanced salt solution and coconutwater as storage media. *Int Endod J* 2011;44:111-115.
12. Mori, GG. Turcio, KHL. Borro, VPB. Mariusso, AM.2007. Evaluation of the knowledge of tooth avulsion of school professionals from Adamantina, Sao Paulo, Brazil. *Dent Traumatol* ;23:2-5
13. Gopikrishna, V. Kandaswamy, D. 2008. A quantitative analysis of coconut water: a new storage media for avulsed teeth. *Mosby.Inc.Chennai*. ppe61 - e65.
14. Blomlof, L. Otteskog, P. 1980. Viability of Human Periodontal Ligament Cells after Storage in Milk or Saliva,*Scand JDentRes* 88:436440.
15. Andreasen, JO, Andreasen, FM.2000. Essentials of Traumatic Injuries to the Teeth. 2nd ed. Copenhagen, *Denmark: Munksgaard and Mosby*; 9-154
16. Naidu, KA. 2003. Vitamin C in human health and disease is still a mystery, an overview. *Noutrition J. 2* : 7.