

Uji Sitotoksitas Sediaan Baru Pasta Ca (OH)₂ Terhadap Sel Fibroblas (*In Vitro*)

Cytotoxicity Test Of New Preparation Ca (OH)₂ Paste On Fibroblast Cell (*In Vitro*)

Laura Emily Sulistyo¹, Eko Fibryanto², Melaniwati²

¹Program Sarjana Kedokteran Gigi, Fakultas Kedokteran Gigi, Universitas Trisakti

²Departemen Konservasi Gigi, Fakultas Kedokteran Gigi, Universitas Trisakti

Correspondence email to: eko.fibryanto@trisakti.ac.id

ABSTRAK

Karies yang tidak dirawat dapat menyebabkan infeksi pulpa. Perawatan infeksi ini adalah perawatan saluran akar. Kegagalan perawatan ini bisa terjadi karena infeksi yang persisten oleh *E. faecalis*. Pemberian medikamen intrakanal merupakan upaya untuk menghilangkan persistensi mikroorganisme dalam saluran akar. Pasta Ca(OH)₂ merupakan obat yang umum digunakan. Sediaan baru pasta Ca(OH)₂ dibuat untuk meningkatkan efek antibakteri. Tujuan penelitian ini adalah melakukan uji sitotoksitas untuk menilai sifat toksik sediaan baru ini sebelum menjadi produk jadi terhadap fibroblas. Sel fibroblas jaringan gingiva dikultur dan diberi ekstrak sediaan baru pasta Ca(OH)₂ dan Calcipex. Percobaan dilakukan dalam tiga pengulangan dan viabilitas sel dievaluasi dengan uji MTT. Analisis statistik dilakukan dengan uji *One-way ANOVA* ($p < 0,05$). Perbandingan viabilitas sel pada sediaan baru pasta Ca(OH)₂ dan Calcipex menunjukkan bahwa sel yang diberi sediaan baru pasta Ca(OH)₂ lebih banyak yang hidup jika dibandingkan dengan Calcipex sebagai kontrol positif ($p < 0,05$). Sediaan baru pasta Ca(OH)₂ dan Calcipex bersifat toksik ringan terhadap sel fibroblas. Kelompok sediaan 1 g Ca(OH)₂ merupakan kelompok yang memiliki efek toksisitas paling ringan.

Kata kunci: Sitotoksitas, Sel fibroblas, MTT, Sediaan baru pasta Ca(OH)₂

ABSTRACT

Untreated caries can lead to pulp infections. The treatment for this infection is root canal treatment. Failure of this treatment can occur due to persistent infection by *E. faecalis*. The administration of intracanal medicaments is an attempt to eliminate the persistence of microorganisms in the root canal. Ca(OH)₂ paste is a widely used medication. The new formulation Ca(OH)₂ paste is made to increase the antibacterial effect. The purpose of this study is to assess the toxicity of this new formulation toward fibroblasts. Gingival tissue fibroblasts cells were cultured and given extracts of Ca(OH)₂ paste new formulation and Calcipex paste. The experiment was carried out in three repetitions and cell viability was evaluated by the MTT assay. Statistical analysis was performed using the one-way ANOVA test ($p < 0,05$). The cells given the Ca(OH)₂ paste were more viable than Calcipex ($p < 0.05$). Ca(OH)₂ paste and Calcipex have mild toxicity against fibroblast cells. The 1 g Ca(OH)₂ group has the lowest toxic effect.

Keywords: Cytotoxicity, Fibroblast cells, MTT, Ca(OH)₂ new formulation paste

PENDAHULUAN

Prevalensi karies di Indonesia tergolong tinggi. Berdasarkan data Riset kesehatan dasar (Riskesdas) tahun 2018, prevalensi karies di Indonesia adalah sebesar 88,8%¹. Jika tidak ditangani, karies dapat mengakibatkan kerusakan pada jaringan keras gigi, penyakit periodontal, dan peradangan pulpa yang dapat menyebabkan infeksi saluran akar dan nekrosis pulpa²⁻⁴. Infeksi saluran akar dapat ditangani dengan perawatan saluran akar (PSA). Keberhasilan PSA cukup dapat diprediksi dengan tingkat keberhasilan yang dilaporkan hingga 86-98%, tetapi masih terdapat kasus-kasus yang mengalami kegagalan dalam PSA. Faktor utama yang mempengaruhi kegagalan PSA adalah persistensi mikroorganisme, terutama bakteri *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*)⁵⁻⁷. Salah satu cara untuk mengurangi jumlah mikroorganisme dari sistem saluran akar adalah dengan menggunakan medikamen intrakanal⁸.

Medikamen intrakanal yang banyak digunakan adalah kalsium hidroksida ($\text{Ca}(\text{OH})_2$). Kelebihan $\text{Ca}(\text{OH})_2$ antara lain: bersifat bakterisidal saat awal penggunaan kemudian bersifat bakteriostatik dengan toksisitas yang rendah, merangsang penyembuhan dan perbaikan, memiliki potential of hydrogen (pH) tinggi yang akan menstimulasi pembentukan sel fibroblas, menghentikan resorpsi interna, dan dapat menetralkan pH asam yang rendah⁸. Sediaan pasta $\text{Ca}(\text{OH})_2$ paling banyak dipakai daripada yang berbentuk bubuk karena lebih mudah diaplikasikan atau diinsersikan pada saluran akar⁹. Pasta $\text{Ca}(\text{OH})_2$ dibuat dengan cara mencampurkan bubuk $\text{Ca}(\text{OH})_2$ dengan bahan pencampur. Bahan pencampur yang dapat digunakan adalah bahan pencampur dengan konsistensi encer, kental, atau dengan kandungan minyak¹⁰.

Bahan pencampur yang digunakan dalam pembuatan sediaan baru pasta $\text{Ca}(\text{OH})_2$ adalah *propylene glycol* dan barium sulfat (BaSO_4). *Propylene glycol* adalah senyawa organik alifatik yang memiliki dua gugus hidroksil per molekul atau alkohol dihidrat¹¹. *Propylene glycol* berbentuk cairan tidak berwarna dengan bau tajam, memiliki rasa manis, memiliki toksisitas yang rendah, dan dapat berdifusi melalui tubulus dentin^{12,13}. Jika *propylene glycol* dan $\text{Ca}(\text{OH})_2$ dikombinasikan dapat meningkatkan efek antimikroba pada

medikamen saluran akar¹³. Barium sulfat adalah endapan garam yang memiliki batas kelarutan sangat rendah dan endapannya bersifat keras dan padat¹⁴. BaSO_4 memiliki kemampuan untuk menyerap sinar X sehingga saat pemeriksaan radiografi dilakukan akan terlihat gambaran yang lebih radiopak daripada jaringan di sekelilingnya¹⁵. Bahan ini tidak bersifat toksik pada saluran akar karena sulit larut dalam air dan jarang menimbulkan alergi¹⁵⁻¹⁷.

Pada penelitian sebelumnya, telah dilakukan uji antibakteri sediaan baru pasta $\text{Ca}(\text{OH})_2$ terhadap bakteri *E. faecalis*. Hasil penelitian tersebut menunjukkan formulasi yang efektif dalam menekan jumlah koloni *E. faecalis* adalah kelompok formulasi baru dengan bubuk $\text{Ca}(\text{OH})_2$ murni sebanyak 1 g¹⁸. Oleh karena itu, pengembangan pasta $\text{Ca}(\text{OH})_2$ buatan dalam negeri perlu dilakukan. Serangkaian uji masih harus dilakukan sebelum produk dapat diproduksi, salah satunya adalah uji sitotoksitas.

METODE PENELITIAN

Jenis penelitian ini adalah eksperimental murni laboratoris (*in vitro*) dengan rancangan penelitian adalah *posttest only control group design*. Penelitian dilakukan di Laboratorium BioCore Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Trisakti.

Prosedur kerja penelitian ini adalah sel fibroblas jaringan gingiva dikultur dengan cara menanam sel pada medium lengkap yang terbuat dari campuran yang dibuat dengan cara mencampurkan *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) 20%, *Amphotericin B-Penicillin-Streptomycin* (APS), dan *Fetal Bovine Serum* (FBS) dan diinkubasi selama 2-7 hari. Sel dipanen dengan cara pembuangan medium lengkap, pencucian sel dengan *Phosphate Buffer Saline* (PBS), penambahan tripsin-EDTA 0,25%, dan dilakukannya sentrifugasi sel selama 2 menit. Sel diberikan pewarnaan dengan *trypanblue* dan dimasukkan ke dalam *slide card* untuk dihitung jumlahnya dibawah mikroskop cahaya dengan hemositometer. Sel dipindahkan ke mikroplat 96-sumuran dan diinkubasi selama 72 jam. Uji sitotoksitas dilakukan dengan metode 3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5 diphenyl tetrazolium bromide (MTT).

Kelompok uji pada penelitian ini terdiri dari sediaan baru pasta $\text{Ca}(\text{OH})_2$ dengan berat 1 g, 1,5 g, dan 2 g, kontrol positif yang merupakan

kelompok ekstrak Ca(OH)_2 produk jadi (Calcipex, Japan), dan kontrol negatif berupa kelompok sel fibroblas jaringan gingiva tanpa perlakuan. Setiap kelompok uji dimasukkan ke dalam mikrolat 96-sumuran dan diinkubasi selama 24 jam. Pengulangan dilakukan sebanyak tiga kali. Larutan MTT dimasukkan ke setiap sumuran dan dihentikan aktivitasnya dengan *acidified isopropanol*. Hasil absorbansi diukur dengan *ELISA reader*, panjang gelombang 595 nm. Hasil pengukuran dari *ELISA reader* berupa *optical density*. Viabilitas sel dihitung menggunakan rumus:

% viabilitas sel =

$$\frac{\text{Mean optical density eksperimen}}{\text{Mean optical density kontrol}} \times 100\%$$

Hasil pengukuran yang diperoleh diinterpretasikan sesuai dengan Tabel 1.

Tabel 1. Klasifikasi toksisitas berdasarkan viabilitas sel¹⁹.

% viabilitas sel	Toksitas
> 90 %	Biokompatibel
60 - 90 %	Toksik ringan
30 - 59 %	Cukup toksik
< 30 %	Sangat toksik

Alat yang digunakan terdiri dari *laminar flow*, mikropipet, mikrolat 96-sumuran, *ELISA reader*, *orbital shaker*, *conical tube*, *dish*, *cryotubes*, *liquid nitrogen chamber*, inkubator CO_2 5%, *centrifuge tube*, *centrifuge*, *slide card*, mikroskop cahaya, dan hemositometer.

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah ekstrak pasta Ca(OH)_2 . Ekstrak dibuat dengan cara melarutkan sediaan baru pasta Ca(OH)_2 dan DMEM 20% (perbandingan 1:1), medium lengkap, sel fibroblas jaringan gingiva, larutan MTT, pasta Ca(OH)_2 produk jadi (Calcipex, Japan), *Penicillin-Streptomycin* (penstrep), PBS, tripsin-EDTA 0,25%, *trypanblue*, *acidified isopropanol*, dan alkohol.

Hasil penelitian dianalisis normalitas data menggunakan uji *Shapiro-wilk*, diketahui bahwa data terdistribusi normal ($p > 0,05$). Selanjutnya data dianalisis dengan uji *One-way ANOVA* dan *Post-hoc Tukey* ($p < 0,05$).

HASIL PENELITIAN

Berdasarkan analisis data diketahui adanya pengaruh sediaan baru pasta Ca(OH)_2

terhadap viabilitas sel fibroblas jaringan gingiva ($p < 0,05$) ditunjukkan pada Tabel 2.

Viabilitas sel dihitung untuk menentukan persentase jumlah sel yang hidup setelah diberi paparan²⁰. Hasil perhitungan viabilitas sel terdapat dalam Tabel 3. Sediaan baru pasta Ca(OH)_2 dengan kandungan 1 g bubuk Ca(OH)_2 memiliki persentase viabilitas sel tertinggi. Calcipex sebagai kontrol positif memiliki persentase viabilitas sel terendah.

Data dianalisis dengan uji *post-hoc Tukey* ($p < 0,05$). Hasil uji *post-hoc Tukey* dapat dilihat pada Gambar 1. Hasil uji ini menunjukkan bahwa tidak ada perbedaan bermakna nilai *optical density* antara kelompok sel fibroblas dengan kelompok sediaan 1 g Ca(OH)_2 . Pada kelompok kontrol negatif ada perbedaan bermakna nilai *optical density* dengan kelompok sediaan 1,5 g Ca(OH)_2 , 2 g Ca(OH)_2 , dan kelompok Calcipex sebagai kontrol positif.

Tabel 2. Nilai rerata, simpang baku, dan kemaknaan pengaruh sediaan Ca(OH)_2 terhadap *optical density* sel fibroblas.

Kelompok uji	Rerata $\pm$ SB	p
Kontrol (-)	0,35700 $\pm$ 0,005292	$< 0,001^*$
1 g Ca(OH)_2 + 2 mL <i>propylene glycol</i> + 0,1 g BaSO_4	0,31900 $\pm$ 0,012530	
1,5 g Ca(OH)_2 + 2 mL <i>propylene glycol</i> + 0,2 g BaSO_4	0,27600 $\pm$ 0,006083	$\pm$
2 g Ca(OH)_2 + 2 mL <i>propylene glycol</i> + 0,2 g BaSO_4	0,31667 $\pm$ 0,016503	
Kontrol (+)	0,26800 $\pm$ 0,002000	$\pm$

**One-way ANOVA* ($p < 0,05$); SB: Simpangan Baku

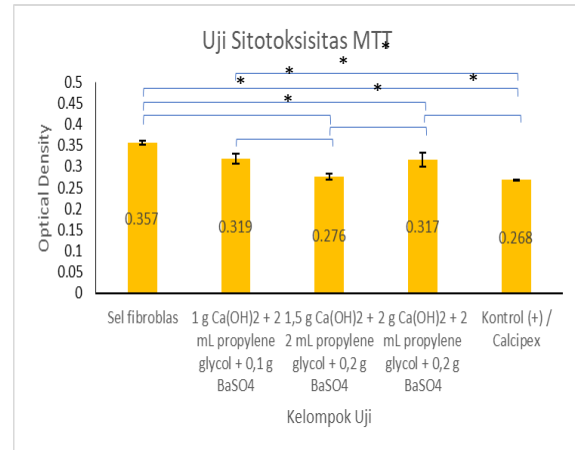
Tabel 3. Viabilitas sel fibroblas (%) setelah diberi perlakuan selama 24 jam.

Kelompok uji	% viabilitas sel
Kontrol (-)	100%
1 g $\text{Ca}(\text{OH})_2$ + 2 mL <i>propylene glycol</i> + 0,1 g BaSO_4	89,36%
1,5 g $\text{Ca}(\text{OH})_2$ + 2 mL <i>propylene glycol</i> + 0,2 g BaSO_4	77,31%
2 g $\text{Ca}(\text{OH})_2$ + 2 mL <i>propylene glycol</i> + 0,2 g BaSO_4	88,80%
Kontrol (+)	75,07%

DISKUSI

Prevalensi karies di Indonesia tergolong tinggi¹. Jika tidak ditangani, karies dapat mengakibatkan infeksi saluran akar. Infeksi saluran akar dapat ditangani dengan PSA⁵. Penyebab utama kegagalan PSA adalah persistensi mikroorganisme, terutama *E. faecalis*⁷. Salah satu cara untuk mengurangi jumlah mikroorganisme dari saluran akar adalah dengan menggunakan medikamen saluran akar. Medikamen yang sering dan efisien digunakan adalah $\text{Ca}(\text{OH})_2$ berbentuk pasta^{8,9}. Pada penelitian sebelumnya telah berhasil ditemukan formulasi baru pasta $\text{Ca}(\text{OH})_2$ yang efektif mengurangi jumlah koloni *E. faecalis*¹⁸. Maka dari itu, uji toksisitas dilakukan untuk menganalisis biokompatibilitas sediaan baru terhadap sel fibroblas. Persentase viabilitas sel menunjukkan pertumbuhan dan jumlah sel yang hidup²¹.

Uji MTT mudah dilakukan, memerlukan waktu yang relatif singkat, memiliki keakuratan yang baik, dan dapat digunakan untuk mengukur sampel dalam jumlah besar. Prinsip uji MTT dalam menentukan viabilitas sel adalah penentuan fungsi mitokondria dengan mengukur aktivitas enzim mitokondria seperti enzim suksinat dehidrogenase. *Nicotinamide adenine dinucleotide hydrogen* (NADH) akan mereduksi garam MTT menjadi kristal formazan ungu yang tidak larut dalam air^{22,23}. Oleh karena itu, sebelum mengukur absorbansi, diperlukan pelarut organik seperti SDS atau isopropanol untuk melarutkan kristal. Hasil dari uji MTT dibaca dengan *ELISA reader* dan diukur dengan absorbansi cahaya pada panjang



Gambar 1. Optical density kelompok uji setelah paparan selama 24 jam pada uji sitotoksitas MTT.

gelombang 595 nm. Konsentrasi formazan ungu dapat ditentukan dengan spektrofotometri visibel. Konsentrasi formazan berbanding lurus dengan jumlah sel hidup. Semakin besar daya absorbansi maka semakin banyak juga jumlah sel yang hidup²⁴. Perubahan garam MTT menjadi formazan ungu dipengaruhi oleh durasi inkubasi. Semakin lama durasi inkubasi akan menghasilkan akumulasi warna dan peningkatan sensitivitas hingga batas tertentu. Namun, waktu inkubasi memiliki batasan durasi karena terdapat sifat sitotoksik dari reagen MTT jika diinkubasi melebihi batas waktu tertentu. Sel yang mati akan kehilangan kemampuan untuk mengubah garam MTT menjadi formazan ungu sehingga perubahan warna menjadi indikator viabilitas sel²⁵.

Hasil pembacaan dari *ELISA reader* adalah *optical density*. *Optical density* adalah rasio intensitas logaritmik dari cahaya yang jatuh pada material dengan cahaya yang ditransmisikan ke suatu material²⁶. Hasil penelitian pada Tabel 2 menunjukkan nilai *optical density*. Nilai *optical density* dari yang tertinggi hingga terendah, yaitu kelompok sediaan 1 g $\text{Ca}(\text{OH})_2$, 2 g $\text{Ca}(\text{OH})_2$, 1,5 g $\text{Ca}(\text{OH})_2$, yang terendah pada kelompok Calcipect.

Viabilitas sel dihitung untuk menentukan persentase jumlah sel yang hidup setelah diberi paparan²⁰. Hasil perhitungan viabilitas sel terdapat dalam Tabel 3. Persentase viabilitas tertinggi hingga terendah, yaitu yaitu kelompok sediaan 1 g $\text{Ca}(\text{OH})_2$, 2 g $\text{Ca}(\text{OH})_2$, 1,5 g $\text{Ca}(\text{OH})_2$, yang terendah pada kelompok Calcipect.

Berdasarkan klasifikasi pada Tabel 1, kelompok sediaan 1 g Ca(OH)_2 , 1,5 g Ca(OH)_2 , 2 g Ca(OH)_2 , dan Calcipex bersifat toksik ringan. Calcipex bersifat paling toksik jika dibandingkan dengan kelompok uji lainnya dan berbeda signifikan dengan kontrol sel fibroblas jaringan gingiva. Kelompok sediaan 1 g Ca(OH)_2 bersifat toksik paling ringan jika dibandingkan dengan kelompok uji lainnya dan tidak berbeda signifikan dengan kelompok kontrol sel fibroblas jaringan gingiva.

Kemungkinan penyebab viabilitas Calcipex hanya sebesar 75,07% dan lebih rendah dari kelompok sediaan 1 g Ca(OH)_2 adalah lebih banyaknya kandungan Ca(OH)_2 . Kalsium hidroksida bersifat toksik dalam saluran akar^{13,19}. *Propylene glycol* bersifat toksik, namun sangat rendah²⁷. BaSO_4 tidak bersifat toksik²⁸. Semakin banyak kandungan Ca(OH)_2 maka semakin tinggi toksisitas pasta Ca(OH)_2 . Viabilitas kelompok sediaan 2 g Ca(OH)_2 lebih tinggi dari kelompok sediaan 1,5 g Ca(OH)_2 mungkin disebabkan oleh adanya kelemahan dalam uji MTT, yaitu dapat terjadinya gangguan latar belakang karena masuknya partikel saat pembuatan sediaan atau saat pembuatan ekstrak. Gangguan ini dapat menyebabkan pengukuran viabilitas sel yang terlalu tinggi²². Efektivitas pasta Ca(OH)_2 terhadap bakteri dinilai berdasarkan pH. Potential of Hydrogen yang tinggi akan menstimulasi pembentukan sel fibroblas dan dapat menetralkan pH asam yang rendah⁸. Semakin banyak kandungan Ca(OH)_2 efektivitas dalam membunuh bakteri semakin tinggi. Dengan demikian, efektivitas pasta Ca(OH)_2 berbanding terbalik dengan toksisitas pasta Ca(OH)_2 .

Keterbatasan dalam penelitian ini adalah pembuatan sediaan baru pasta Ca(OH)_2 yang dilakukan secara manual menggunakan spatula metal di atas *glass plate* sehingga memungkinkan terjadinya kontaminasi.

SIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian, sediaan baru pasta Ca(OH)_2 dan Calcipex sebagai kontrol positif bersifat toksik ringan terhadap sel fibroblas jaringan gingiva. Kelompok sediaan 1 g Ca(OH)_2 merupakan kelompok yang memiliki efek toksisitas paling ringan dan tidak berbeda signifikan dengan kelompok kontrol negatif.

SARAN

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai bahan tambahan dan suhu penyimpanan yang tepat agar pada kelompok sediaan 1 g Ca(OH)_2 tidak mengendap dalam tiga hari jika disimpan dalam *syringe*.

DAFTAR PUSTAKA

1. Kemkes RI. *Riset Kesehatan Dasar: Badan Penelitian Dan Pengembangan Kesehatan*.; 2019.
2. Veiga NJ, Aires D, Douglas F, et al. Dental caries: A review. *J Dent Oral Heal*. 2016;2(5):1-3.
3. Egasari Winahyu KM, Turmuzi A, Hakim F. Risiko Kejadian Karies Gigi Ditinjau dari Konsumsi Makanan Kariogenik pada Anak Usia Sekolah di Kabupaten Tangerang. *Faletehan Heal J*. 2019;6(1):25-29.
4. Conrads G. Pathophysiology of dental caries. In: *Caries Excavation: Evolution of Treating Cavitated Carious Lesions*. Vol 27. Karger Publishers; 2018:1-10.
5. Tabassum S, Khan FR. Failure of endodontic treatment: The usual suspects. *Eur J Dent*. 2016;10(01):144-147.
6. Kumar A, Tamanna S, Iftekhhar H. Intracanal medicaments–Their use in modern endodontics: A narrative review. *J Oral Res Rev*. 2019;11(2):94.
7. Sakko M, Tjäderhane L, Rautemaa-Richardson R. Microbiology of root canal infections. *Prim Dent J*. 2016;5(2):84-89.
8. Kim D, Kim E. Antimicrobial effect of calcium hydroxide as an intracanal medicament in root canal treatment: a literature review-Part I. In vitro studies. *Restor Dent Endod*. 2014;39(4):241-252.
9. Kusuma ARP. Pengaruh lama aplikasi dan jenis bahan pencampur serbuk kalsium hidroksida terhadap kekerasan mikro dentin saluran akar. *Odonto Dent J*. 2016;3(1):48-54.
10. Widiadnyani NKE, Mulyawati E, Dayinah HS. Pengaruh Lama Kontak Kalsium Hidroksida dengan Bahan Pencampur Klorheksidin Diglukonat 2%, Salin, dan Lidokain Hcl 2% sebagai Bahan Sterilisasi Terhadap pH Dentin pada Segmen Sepertiga Apikalsaluran Akar. *J Kedokt Gigi*. 2018;5(2):176-188.
11. Sirous M, Sinning N, Schneider TR, Friese

- U, Lorenz J, Engel AK. Chemosensory event-related potentials in response to nasal propylene glycol stimulation. *Front Hum Neurosci.* 2019;13:99.
12. Fiume MM, Bergfeld WF, Belsito D V, et al. Safety Assessment of Propylene Glycol, Tripropylene Glycol, and PPGs as Used in Cosmetics. *J Toxicol.* 2012;31(2):245S-260S. doi:10.1177/1091581812461381
13. Srinivas S, Jibhakte NG, Baranwal R, Avinash A, Tandil Y, Rathi S. Propylene Glycol: A New Alternative for an Intracanal Medicament. *J Int Oral Heal.* 2016;8(5):611-614.
14. Ali AM, Messaoud H. Barium Sulphate Deposits. *Energy Procedia.* 2019;157:879-891.
15. Collares FM, Klein M, Santos PD, et al. Influence of Radiopaque Fillers on Physicochemical Properties of a Model Epoxy Resin-based Root Canal Sealer. *J Appl Oral Sci.* 2013;21(6):533-539.
16. Ba-Hattab R, Al-Jamie M, Aldreib H, Alessa L, Alonazi M. Calcium Hydroxide in Endodontics: An Overview. *Open J Stomatol.* 2016;6(12):274-289.
17. Aronson JK. *Meyler's Side Effects of Drugs: The International Encyclopedia of Adverse Drug Reactions and Interactions.* 16th Ed. Elsevier; 2016.
18. Berlianti S. *Efek Pengembangan Formulasi Pasta Kalsium Hidroksida Terhadap Jumlah Koloni Enterococcus Faecalis Sebagai Medikamen Saluran Akar (Penelitian Ex Vivo).* [Skripsi]. Universitas Trisakti; 2021.
19. Jahromi MZ, Ranjbarian P, Shiravi S. Cytotoxicity Evaluation of Iranian Propolis and Calcium Hydroxide on Dental Pulp Fibroblasts. 2014;8(3):130-133.
20. Mahfur. *Uji Sitotoksik Fraksi Etil Asetat Ekstrak Etanol Akar Pasak Bumi (Eurycoma Longifolia Jack) Terhadap Sel Kanker T47D Dengan Metode 3-(4,5 Dimetiltiazol -2-Il)- 2,5 Difenil Tetrazolium Bromide (MTT).*; 2009.
21. Khan Y. Characterizing the Properties of Tissue Constructs for Regenerative Engineering. In: *Reference Module in Biomedical Sciences.* Vol 3rd Ed. Elsevier; 2019:542-543.
22. Aslantürk Ö. In Vitro Cytotoxicity and Cell Viability Assays: Principles, Advantages, and Disadvantages. In: editors. [Internet]. InTech; 2018 [cited 2021 Jul 6]. Available from: In: Larramendy M, Soloneski S, eds. *Genotoxicity - A Predictable Risk to Our Actual World.* ; 2018. doi:10.5772/intechopen.71923
23. Ernawati F. *Uji sitotoksik Isolat Aktif dari Ekstrak Kloroform Rumpun Mutiara (Hedyotis corymbosa (L.) Lamk.) terhadap Sel HELA dan SIHA.* Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam; 2010.
24. Septisetyani EP, Ningrum RA, Romadhani Y, Wisnuwardhani PH, Santoso A. Optimization of Sodium Dodecyl Sulphate as a Formazan Solvent and Comparison of 3-(4,-5-dimethylthiazo-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) Assay with WST-1 Assay in MCF-7 Cells. *Indones J Pharm.* 25(4):245-254.
25. Riss TL, Moravec RA, Niles AL, et al. Cell Viability Assays. *Assay Guid Man.* Published online July 1, 2016. Accessed April 6, 2023. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK144065/>