

Uji Sitotoksitas Hidroksiapatit Cangkang Telur Ayam Ras (*Gallus gallus*) terhadap Sel Fibroblas Ligamen Periodontal Manusia

(Cytotoxicity Test of Ras Eggshell (*Gallus gallus*) Hydroxyapatite on Human Ligament Periodontal Fibroblast Cell)

Devi Komala¹, Muhammad Nurul Amin², Yani Corvianindya Rahayu³

¹ Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember

² Bagian Biomedik, Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember

³ Bagian Biologi Mulut Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember

Abstrak

Periodontitis adalah penyakit inflamasi yang menyebabkan kerusakan pada jaringan periodontal, termasuk sel fibroblas ligamen periodontal. Penelitian saat ini telah mengembangkan konsep *tissue engineering* untuk mempercepat regenerasi dan proliferasi sel-sel ligamen periodontal. Salah satu komponen utama dalam *tissue engineering* yaitu *scaffold*, hidroksiapatit adalah biomaterial yang dapat digunakan sebagai *scaffold*. Cangkang telur ayam merupakan limbah yang berpotensi menjadi sumber biomaterial hidroksiapatit yang digunakan sebagai *scaffold*. Sebelum diaplikasikan sebagai *scaffold* dalam dunia medis, perlu dilakukan pengujian sitotoksitas. Tujuan Penelitian adalah mengetahui ada/tidaknya efek toksik hidroksiapatit cangkang telur ayam ras (*Gallus gallus*) pada konsentrasi tertentu terhadap sel fibroblas ligamen periodontal manusia. Penelitian ini menggunakan sel primer fibroblas ligamen periodontal manusia (5×10^3) dalam *microplate* 96 well yang dibagi menjadi 7 kelompok yaitu kontrol sel, kontrol media tanpa sel dan kelompok perlakuan dengan konsentrasi hidroksiapatit cangkang telur ayam 100 µg/ml, 75 µg/ml, 50 µg/ml, 25 µg/ml dan 25 µg/ml dan diinkubasi selama 24 jam. Sitotoksitas diukur dengan menggunakan metode MTT assay. Data berupa nilai-nilai *optical density* menggambarkan viabilitas sel yang hidup dan dilakukan pembacaan menggunakan ELISA reader, kemudian dilanjutkan analisis data menggunakan metode One way ANOVA. Jumlah sel fibroblas ligamen periodontal pada semua konsentrasi menunjukkan persentase kehidupan sel lebih dari 90%. Hidroksiapatit cangkang telur ayam pada semua konsentrasi yang di uji tidak toksik terhadap sel fibroblas ligamen periodontal manusia.

Kata kunci: cangkang telur ayam, fibroblas ligamen periodontal manusia, hidroksiapatit, uji sitotoksitas.

Abstract

Periodontitis is an inflammation disease of the periodontal tissues surrounding the teeth, include periodontal ligament fibroblast cell. The recently researches developed *tissue engineering* concept to accelerate regeneration and proliferation periodontal ligament cells. One of the major components of *tissue engineering* is *scaffold*. The hydroxyapatite is biomaterial that can be used as *scaffold*. The egg shell has the potential biowaste to be a source of hydroxyapatite biomaterial. Before being applied as a *scaffold* in the medical field, cytotoxicity testing needs to be done. This study aimed to examine toxicity effect of egg shell hydroxyapatite in various concentration toward human periodontal ligament fibroblast cells. This study used human periodontal ligament fibroblast primary cells (5×10^3) in *microplate* 96 wells which divided into 7 groups, control cells, control media without cells and the treatment groups with concentration egg shell hydroxyapatite 100 µg/ml, 75 µg/ml, 50 µg/ml, 25 µg/ml and 25 µg/ml and incubated for 24 hours. Cytotoxicity test was conducted using MTT assay. Optical density values describe the viability of living cells and the readings were done using ELISA readers, subsequently the data were analyzed using One way ANOVA. The number of human periodontal ligament cells at all concentration showed that the percentage of cell life is more than 90%. Egg shell hydroxyapatite at all concentrations tested is not toxic toward human periodontal ligament fibroblast cells.

Keywords: Egg shell, Human periodontal ligament fibroblast, Hydroxyapatite, Cytotoxicity assay

Korespondensi (Correspondence) : Muhammad Nurul Amin, Bagian Biomedik, Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember, Jl.Kalimantan No 37, Jember, E-mail: m_nurul_amin.fkg@unej.ac.id

Periodontitis adalah suatu penyakit inflamasi jaringan periodontal yang disebabkan oleh kelompok mikroorganisme tertentu, yang mengakibatkan kerusakan pada ligamen dan tulang alveolar dengan pembentukan poket, resesi gingiva atau keduanya.¹Angka kejadian periodontitis di Indonesia saat ini masih tergolong tinggi, berdasarkan hasil Riset Kesehatan Dasar (RIKESDAS) tahun 2018 periodontitis di Indonesia sebesar 74,1%.² Perawatan untuk memulihkan jaringan periodontal yang rusak akibat periodontitis dapat dilakukan dengan perawatan regeneratif.¹

Perawatan regeneratif dipilih karena dapat menghilangkan kerusakan jaringan sekaligus mempertahankan segi estetik

pasien.¹ Konsep regeneratif mulai berkembang dengan adanya teknologi *tissue engineering*, untuk mempercepat regenerasi dan penyembuhan jaringan periodontal.³ *Tissue engineering* terdapat tiga komponen utama keberhasilan terapi, yaitu *scaffold* atau material perancah, sel punca (*stem cell*) dan faktor pertumbuhan atau *growth factor*.⁴ Kesuksesan *tissue engineering scaffold* akan ditentukan dari suatu bahan yang dapat mendukung pertumbuhan dan diferensiasi sel menjadi jaringan yang tepat, selain itu harus mempunyai biokompatibilitas sehingga dapat mengkondisikan sel-sel yang akan di tanam .^{5,6} Salah satu biomaterial yang dapat digunakan sebagai *scaffold* yaitu hidroksiapatit,

merupakan komponen mineral utama pada matriks tulang.⁵

Cangkang telur ayam ras (*Gallus gallus*) merupakan salah satu limbah yang berpotensi sebagai sumber hidroksiapatit.⁷ Cangkang telur ayam memiliki kandungan kalsium yang tinggi, mengandung 94% kalsium karbonat (CaCO₃), 1% magnesium karbonat, 1% kalsium fosfat dan 4% bahan organik, fingginya kadar kalsium karbonat (CaCO₃) dalam telur dapat dimanfaatkan dalam sintesis hidroksiapatit.⁸ Cangkang telur ayam digunakan karena mudah didapat dan telur ayam merupakan sumber protein hewani yang banyak dikonsumsi masyarakat, sehingga limbahnya menumpuk. Hidroksiapatit dari cangkang telur ayam ras memiliki peluang untuk diaplikasi dalam bidang medis, sehingga beberapa syarat harus terpenuhi, salah satunya adalah biokompatibilitas.

Biokompatibilitas sangat penting agar tidak terjadi kegagalan karena penolakan oleh *host*. Selain itu, merupakan syarat biologis yang harus dimiliki biomaterial baru diantaranya melalui uji sitotoksitas.⁹ Uji sitotoksitas pada penelitian ini menggunakan sel fibroblas ligamen periodontal karena merupakan sel penting dalam regenerasi jaringan penyangga gigi yang dapat mendukung perlekatan kembali gigi ke tulang alveolar.¹⁰

Berdasarkan uraian diatas, peneliti ingin mengetahui mengetahui ada/tidaknya efek toksik hidroksiapatit cangkang telur ayam ras pada sel fibroblas ligamen periodontal manusia.

METODE PENELITIAN

Penelitian ini dimulai dengan mendapatkan izin penelitian dan izin etika yang dikeluarkan oleh Komisi Etik Penelitian Kesehatan (KEPK) Fakultas Kedokteran Gigi, Universitas Jember No. 615/UN25.8/KEPK/DL/2019. Jenis Penelitian yang digunakan adalah ekperimental laboratoris. Rancangan penelitian yang digunakan adalah *the post test only control group design*. Sampel yang digunakan adalah hidroksiapatit dari cangkang telur ayam diperoleh dari stok yang sudah jadi pada penelitian sebelumnya dan sel fibroblas ligamen periodontal manusia didapat dari Laboratorium Kedokteran Molekuler Center for

Development of Advance Science and Technology (CDAST) Universitas Jember. Pada penelitian ini sampel dibagi menjadi 7 kelompok perlakuan yaitu, 5 kelompok hidroksiapatit cangkang telur ayam dengan berbagai konsentrasi: 100 µg/ml, 75 µg/ml, 50 µg/ml, 25 µg/ml dan 25 µg/ml. Satu kelompok kontrol sel sebagai kontrol positif dengan persentase sel hidup 100%. Satu kelompok kontrol media tanpa sel sebagai kontrol negatif dengan persentase sel hidup 0%.

Kultur sel fibroblas ligamen periodontal yang telah mencapai tingkat kepadatan 80% dipanen dan dihitung untuk dikultur kembali pada *microplate 96 well* dengan densitas 5x10³ sebanyak 100µl, sebagai subjek perlakuan yang akan dipapar dengan hidroksiapatit cangkang telur ayam. Sel fibroblas ligamen periodontal disiapkan sejumlah tiga replikasi untuk setiap kelompok. Sel selanjutnya diinkubasi pada inkubator CO₂ 5% pada suhu 37° selama 24 jam.

Bubuk hidroksiapatit cangkang telur ayam di larutkan dengan medium sel DMEM dengan konsentrasi 100 µg/ml, 75 µg/ml, 50 µg/ml, 25 µg/ml dan 25 µg/ml. Kemudian disimpan dalam kulkas dengan suhu ± 4°C selama 24 jam. Setelah 24 jam, larutan hidroksiapatit cangkang telur ayam dilakukan penyaringan sekaligus sterilisasi secara mekanis menggunakan *disposable syringe filter* 0,2µm.¹¹

Sel fibroblas ligamen periodontal yang telah dikultur semalam pada *microplate 96 well* disiapkan untuk diberi perlakuan dengan hidroksiapatit cangkang telur ayam, kemudian *microplate 96 well* diinkubasi pada inkubator CO₂ 5% pada suhu 37° selama 24 jam. Setelah selesai diinkubasi, dilakukan Uji MTT dengan menambahkan larutan MTT sebanyak 100µl kedalam masing-masing *well* dan inkubasi kembali kedalam inkubator CO₂ 5% pada suhu 37° selama 4 jam. Reaksi MTT dihentikan dengan memberikan stopper (*Solubilizer*) sebanyak 100µl pada setiap *well* kemudian di shaker selama 1 jam. Pembacaan nilai *optical density* (OD) secara spektrofotometri menggunakan *ELISA reader* pada panjang gelombang 560 nm. Rata-rata persentase sel yang hidup dihitung dari nilai *optical density* (absorbansi) masing-masing sampel pada setiap konsentrasi terhadap nilai kontrol dengan rumus sebagai berikut¹²:

$$\% \text{ Viabilitas Sel} = \frac{\text{OD perlakuan} - \text{OD kontrol media}}{\text{OD kontrol Sel} - \text{OD kontrol media}} \times 100\%$$

Keterangan:

- % viabilitas sel = Persentase jumlah kehidupan sel setelah di uji.
- Absorbansi tes = Nilai Optical Density (OD) formazan setiap sampel
- Absorbansi Media = Nilai OD formazan pada rata-rata setiap kontrol media.
- Absorbansi Sel = Nilai OD formazan pada rata-rata kontrol sel.

Berdasarkan perhitungan dengan rumus diatas, suatu material dikatakan non-toksik apabila persentase kehidupan sel lebih dari 90%.¹³

Analisa data dilakukan menggunakan komputer dengan bantuan perangkat lunak berupa program statistik SPSS versi 26. Data yang diperoleh dilakukan uji normalitas data menggunakan uji *Shapiro Wilk* dan uji homogenitas menggunakan uji *Lavene*. Apabila data yang diperoleh berdistribusi normal dan homogen, dilakukan uji parametrik menggunakan uji *One Way Anova* dilanjutkan dengan uji *LSD (Least Significant Differece)* untuk mengetahui perbedaan antar kelompok.

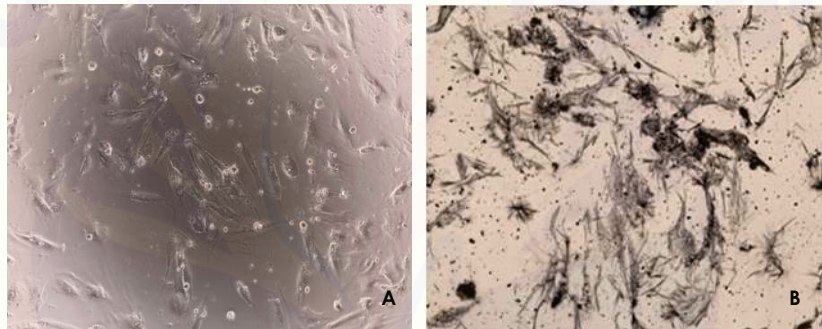
HASIL

Penelitian ini menggunakan sel fibroblas yang berasal dari jaringan periodontal manusia. Gambaran Mikroskopis sel fibroblas sebelum dan sesudah dilakukan uji MTT disajikan pada Gambar 1.

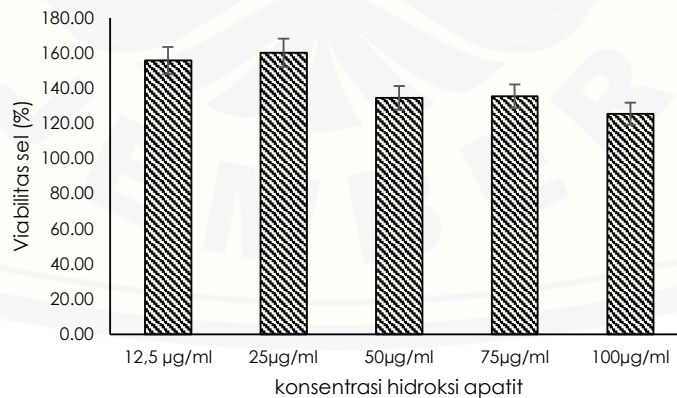
Gambar 1a menunjukkan gambaran khas dari sel fibroblas yaitu memiliki sitoplasma

bercabang yang mengelilingi nukleus berbentuk lonjong dengan satu atau dua nucleolus dan menempel pada dasar permukaan plate tempat menanam sel tersebut. Gambar 1b menunjukkan sel hidup yang mampu mereduksi garam MTT menjadi kristal formazan yang berwarna biru, viabilita sela tau jumlah sel yang hidup terkuantifikasi sesuai dengan kristal formazan yang terbentuk. Setelah dilakukan pembacaan hasil dengan *ELISA reader* dan dihitung dengan rumus *optical density* didapatkan hasil rerata persentase sel fibroblas yang hidup disajikan pada gambar 2.

Pada Gambar 2 dapat dilihat bahwa kelompok perlakuan 100 µg/ml, 75 µg/ml, 50 µg/ml, 25 µg/ml dan 12,5 µg/ml memiliki persentase viabilitas sel lebih tinggi daripada kelompok kontrol. Pada histogram diatas dapat dilihat pula semakin tinggi konsentrasi hidroksiapatit cangkang telur ayam, semakin menurun persentase viabilitas sel fibroblas ligamen periodontal manusia. Semua konsentrasi yang di teliti tidak toksik terhadap sel fibroblas ligamen periodontal manusia.



Gambar 1. Sel Fibroblas (a. sebelum uji MTT; b. sesudah uji MTT)



Gambar 2. Viabilitas sel fibroblas ligamen periodontal manusia pada semua kelompok perlakuan

Tabel 1. Viabilitas Hasil Uji MTT pada Sel Fibroblas

Kelompok perlakuan	Viabilitas sel (%)
Kontrol	100 ± 0,023
Konsentrasi 12,5µg/ml	155 ± 0,026 ^a
Konsentrasi 25µg/ml	160 ± 0,014 ^a
Konsentrasi 50µg/ml	134 ± 0,025 ^a
Konsentrasi 75µg/ml	135 ± 0,007 ^a
Konsentrasi 100µg/ml	125 ± 0,027 ^{a,b,c}

a, berbeda bermakna terhadap Kelompok Kontrol Sel; b, berbeda bermakna terhadap Kelompok Konsentrasi 12,5µg/ml; c, berbeda bermakna berdasarkan Konsentrasi 25µg/ml

Hasil analisis normalitas data menggunakan uji *Saphiro-Wilk* terhadap nilai persentase viabilitas sel fibroblas didapatkan seluruh data berdistribusi normal dengan $p > 0,05$. Kemudian data dianalisa homogenitasnya menggunakan uji *Levene* dan hasil menunjukkan data berdistribusi normal dengan $p > 0,05$. Selanjutnya dilakukan uji parametrik menggunakan uji *One Way Anova* dan didapatkan signifikansi 0,003 ($p < 0,05$), yang berarti bahwa hidroksiapatit cangkang telur ayam mampu menginduksi proliferasi sel fibroblas ligamen periodontal. Pada tahap akhir analisis data dilakukan uji lanjut *Least Significance Difference (LSD)* untuk mengetahui perbedaan seluruh kelompok dengan derajat kemaknaan ($p < 0,05$). Hasil uji *LSD* ditunjukkan pada tabel 1.

Pada Tabel 1 menunjukkan bahwa dibandingkan dengan Kontrol sel, semua kelompok perlakuan dari berbagai konsentrasi berbeda bermakna sedangkan pada kelompok konsentrasi 100µg/ml berbeda bermakna jika dibandingkan dengan kelompok konsentrasi 12,5 dan 25µg/ml.

PEMBAHASAN

Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui ada/tidaknya efek toksik hidroksiapatit cangkang telur ayam ras (*Gallus gallus*) pada konsentrasi tertentu terhadap sel fibroblas ligamen periodontal manusia. Hasil penelitian menunjukkan pada kelompok perlakuan hidroksiapatit cangkang telur ayam pada konsentrasi 12,5µg/ml, 25µg/ml, 50µg/ml, 75µg/ml dan 100µg/ml terhadap kultur sel fibroblas ligamen periodontal berturut-turut adalah 155%, 160%, 134%, 135% dan 125%. Menurut klasifikasi jumlah sel yang hidup oleh *Heravi dkk*¹³ dan *Harsini*¹⁴ dapat disebut non-toksik karena sel yang hidup lebih dari 90%. Sehingga, dapat disimpulkan bahwa Hidroksiapatit cangkang telur ayam tidak bersifat toksik terhadap sel kultur sel fibroblas ligamen periodontal manusia pada konsentrasi yang diteliti.

Hasil penelitian menunjukkan persentase sel hidup atau nilai viabilitas sel tertinggi di antara kelompok perlakuan hidroksiapatit cangkang telur ayam yaitu pada konsentrasi 25µg/ml sebanyak 160% dan persentase sel hidup terendah pada konsentrasi tertinggi yaitu 100µg/ml sebanyak 125%. Tingginya jumlah sel fibroblas yang hidup pada konsentrasi 25µg/ml karena pada konsentrasi tersebut menyediakan kondisi

yang optimal dibandingkan kelompok konsentrasi yang lain. Menurut *Putra dkk*¹⁵, kondisi yang optimal menstimulasi faktor-faktor yang mempengaruhi proliferasi sel fibroblas, yaitu *Platelet Derived Growth Factor (PDGF)*, *basic Fibroblast Growth Factor (bFGF)* dan *Transforming Growth Factor (TGF-β)* yang dihasilkan oleh makrofag teraktivasi dan sel endote. Faktor-faktor pertumbuhan tersebut saling mempengaruhi dan berikatan satu sama lain sehingga, menginduksi sel fibroblas untuk bermigrasi, berproliferasi dan berdiferensiasi. Selain itu, tingginya kadar faktor-faktor pertumbuhan tersebut dapat menyebabkan tingginya jumlah sel yang hidup (*Kartono et al, 2014*).¹⁶

Hasil penelitian uji sitotoksitas hidroksiapatit cangkang telur ayam ini dapat digunakan sebagai acuan untuk menentukan konsentrasi paparan optimum pada uji klinis maupun uji *in vivo*. Konsentrasi optimum ditentukan berdasarkan konsentrasi yang mampu mempertahankan viabilitas sel dengan baik. Hasil penelitian menunjukkan hidroksiapatit dengan konsentrasi 100 µg/ml, 75 µg/ml, 50 µg/ml, 25 µg/ml dan 12,5 µg/ml mampu mempertahankan viabilitas sel fibroblas ligamen periodontal manusia dengan baik yaitu diatas 90%. Dari kelima konsentrasi tersebut, konsentrasi 100 µg/ml dipilih sebagai konsentrasi optimum karena memiliki persentase viabilitas sel sebesar 125%. Hasil ini sesuai dengan penelitian *Hattori dkk*¹⁷ bahwa biomaterial yang sesuai untuk proliferasi sel adalah yang tidak memiliki persentase viabilitas terlalu tinggi dan tidak memiliki potensi sitotoksik.

Berdasarkan hasil uji MTT assay didapat rata-rata nilai absorbansi seluruh kelompok perlakuan hidroksiapatit cangkang telur ayam lebih besar dari rata-rata nilai absorbansi kontrol sel. Hal ini menunjukkan bahwa sel mengalami proliferasi, sesuai dengan pernyataan *Bahi dkk*¹⁸ bahwa nilai absorbansi yang teramati lebih besar daripada nilai absorbansi kontrol maka kemampuan sel berproliferasi tinggi. Sebaliknya, jika nilai absorbansi yang teramati lebih kecil dari nilai absorbansi kontrol sel, maka sel mengalami reduksi atau kemampuan sel berproliferasi rendah. Menurut *Kasaj dkk*¹⁹ telah menemukan bahwa hidroksiapatit dapat menginduksi proliferasi sel fibroblas ligamen periodontal manusia. Selain itu, Meningkatnya viabilitas sel fibroblas ligamen periodontal disebabkan karna rendahnya konsentrasi kalsium yang masuk ke dalam sel tersebut dapat membuat

sel memiliki kemampuan untuk melakukan pertahanan dan proliferasi sel.¹⁴

Cangkang telur ayam memiliki kandungan terbanyak adalah kalsium. Kadar kalsium (Ca²⁺) yang terkandung pada hidroksiapatit cangkang telur ayam mempengaruhi proliferasi sel pada semua kelompok. Ketika hidroksiapatit berkontak dengan media sel, maka akan terurai menjadi ion kalsium dan ion fosfat. Ion kalsium dalam hidroksiapatit masuk kedalam sel melalui channel kalsium.²⁰ Sel memiliki reseptor kalsium yang disebut CaSR (calsium sensing receptor) yang berfungsi untuk medeteksi perubahan Ca²⁺ ekstraseluler. Ketika konsentrasi Ca²⁺ ekstraseluler meningkat dapat mengaktifkan CaSR, kemudian Ca²⁺ keluar dari simpanan intrasel dalam retikulum endoplasma dan mitokondria. Peningkatnya Ion Ca²⁺ di sitosol akan meningkatkan ikatan Ca²⁺ dengan kalmodulin, sehingga terjadi kompleks Ca²⁺-kalmodulin. Kompleks Ca²⁺-kalmodulin menyebabkan defosforilasi nuclear factor of activated T-cells (NFAT). Aktivasi NFAT memicu migrasi ke nukleus dan mengaktifasi diferensiasi sel.²¹

Pada penelitian sebelumnya Nastiti dkk.¹⁴ Uji bioviabilitas hidroksiapatit dari cangkang kerang darah (*Anadara granosa*) menggunakan satuan konsentrasi miligram, hasil menunjukkan semakin bertambah konsentrasi semakin menurun persentase sel hidup, sehingga tingkat apoptosisnya semakin tinggi. Pada penelitian ini konsentrasinya menggunakan satuan mikrogram, sehingga lebih rendah daripada miligram. Berarti tingkat apoptosisnya lebih rendah dan proliferasi sel lebih tinggi. Meningkatnya viabilitas sel fibroblas ligamen periodontal disebabkan karena rendahnya konsentrasi kalsium yang masuk ke dalam sel tersebut dapat membuat sel memiliki kemampuan untuk melakukan pertahanan dan proliferasi sel.¹⁴ Cangkang telur ayam memiliki kandungan terbanyak adalah kalsium. Kadar kalsium (Ca²⁺) yang terkandung pada hidroksiapatit cangkang telur ayam mempengaruhi proliferasi sel pada semua kelompok.

Hidroksiapatit Cangkang Telur Ayam merupakan biomaterial alternatif yang tidak toksik terhadap kultur sel fibroblas ligamen periodontal manusia dengan konsentrasi paparan 100 µg/ml, 75 µg/ml, 50 µg/ml, 25 µg/ml dan 12,5 µg/ml. Konsentrasi optimum hidroksiapatit cangkang telur ayam adalah 100 µg/ml.

DAFTAR PUSTAKA

- Newman, Michael G., Takei, Henry H., Klokkevold PR. Newman and Carranza's Clinical Periodontology Thirteenth Edition. 2017;
- Riskesdas. Riset Kesehatan Dasar 2018. Kementerian Kesehatan Republik Indonesia. 2018;
- Liang Y, Luan X, Liu X. Recent advances in periodontal regeneration: A biomaterial perspective. *Bioact Mater.* 2020;5(2):297–308. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2020.02.012>
- Kumar A, S M-U-N, A Z. Tissue engineering - the promise of regenerative dentistry. *Biol Med.* 2011;3(2):108–13.
- Sherlyana Gabrielle K., Widyastuti dan HWS. Biokompatibilitas Hidroksiapatit Graff dari Cangkang Kerang Darah (*Anadara granosa*) Terhadap Kultur Sel Fibroblas. *Dent J Kedokt gigi.* 2014; 9 (2)
- Indahyani DE. Peranan Scaffold dalam Bone Tissue Engineering. *stomatognatik J Kedokteran Gigi.* 2008;5 (2)
- Ardhiyanto HB. Peran hidroksiapatit sebagai bone graff dalam proses penyembuhan tulang. *stomatognatik J Kedokt Gigi.* 2011; 8 (2)
- Hincke MT, Nys Y, Gautron J, Mann K, Rodriguez-Navarro A, McKee MD. The eggshell: structure, composition and mineralization. *Front Biosci (Landmark Ed).* 2012 Jan 1;17:1266-80. doi: 10.2741/3985.
- Ibrahim MS, El-Wassefy NA, Farahat DS. Biocompatibility of dental biomaterials. In: *Biomaterials for Oral and Dental Tissue Engineering.* 2017. p: 1-7
- Jönsson D, Nebel D, Bratthall G, Nilsson BO. The human periodontal ligament cell: A fibroblast-like cell acting as an immune cell. *Journal of Periodontal Research.* 2011. 46 (2). <https://doi.org/10.1111/j.1600-0765.2010.01331.x>
- Kamadajaja MJK, Abraham JF, Laksono H. Biocompatibility of Portunus Pelagicus Hydroxyapatite Graff on Human Gingival Fibroblast Cell Culture. *Med Arch (Sarajevo, Bosnia Herzegovina).* 2019;73(5):303–6.
- Stockerta, Jr., Alfonso Blázquez-Castroa, Magdalena Cañetea Richard W. Horobinb Ángeles Villanueva. MTT assay for cell viability: Intracellular localization of the formazan product is in lipid droplets. *Acta Histochemica.* 2012; (114) 8: 785-796. <https://doi.org/10.1016/j.acthis.2012.01.006>
- Heravi F, Ramezani M, Poosti M, Hosseini M, Shajiei A, Ahrari F. In Vitro Cytotoxicity Assessment of an Orthodontic Composite Containing Titanium-dioxide Nanoparticles. *J Dent Res Dent Clin Dent Prospects.* 2013; 7(4):192-8. doi: 10.5681/joddd.2013.031.
- Nastiti AD, Widyastuti W, Laihah FM. Bioviabilitas Hidroksiapatit Ekstrak

- Cangkang Kerang Darah (Anadara granosa) Terhadap Sel Punca Mesenkimal Sebagai Bahan Graff Tulang Alveol. *Denta*. 2015;9(2):122.
15. Putra ATW, Ade W, Hamidy MY. Tingkat Kepadatan Fibroblas pada Luka Sayat Mencit dengan Pemberian Gel Lidah Buaya (Aloe chinensis Baker). *Jurnal Universitas Riau*. 2013. <http://repository.unri.ac.id:80/handle/123456789/1590>
 16. Kartono, GS., Widyastuti, Setiawan, HW. Biokompatibilitas graff cangkang kerang darah terhadap kultus sel fibroblas. *Surabaya: Denta*, 2014; 8(1).
 17. Hattori T., K. Hirai, P. Wang dan S. Fujimura. 2004. Proliferation Of Cultured Human Gingival Fibroblasts Caused By Isradipine, A Dihydropyridine-Derivative Calcium Antagonist. *European Journal of Medical Research*. 9: 313-315.
 18. Bahi M, Jacob C, Khairan K. Efek Sitotoksik Haarlem Oil Terhadap HL-60 Cell Line Dan Steinerema Feltiae (Cytotoxic Effect of Haarlem Oil on HL-60 Cell Line and Steinerema feltiae). *J Kedokt Hewan - Indones J Vet Sci*. 2016; 10 (2)
 19. Kasaj A, Willershausen B, Junker R, Stratul SI, Schmidt M. Human periodontal ligament fibroblasts stimulated by nanocrystalline hydroxyapatite paste or enamel matrix derivative: An in vitro assessment of PDL attachment, migration, and proliferation. *Clin Oral Invest*. 2012; 16:745-754.
 20. Pinto MCX, Kihara AH, Goulart VAM, Tonelli FMP, Gomes KN, Ulrich H, et al. Calcium signaling and cell proliferation. *Cell Signal*. 2015 Nov;27(11):2139-49. doi: 10.1016/j.cellsig.2015.08.006.
 21. Yanai R, Tetsuo F, Ito S, Itsumi M, Yoshizumi J, Maki T, et al. Extracellular calcium stimulates osteogenic differentiation of human adipose-derived stem cells by enhancing bone morphogenetic protein-2 expression. *Cell Calcium*. 2019; 83:102058.