

KARAKTERISASI FTIR DAN UJI TOKSISITAS HIDROKSIAPATIT NANOKRISTALIN *CORBICULA MOLTKIANA* TERHADAP SEL *HUMAN DERMAL FIBROBLAST ADULT*

Andries Pascawinata¹, Syukri Arief², Citra Lestari³, Muhammad Shalahuddin Al Majiid⁴

ABSTRACT

Introduction: One method for reconstructing bones is through bone grafting. Hydroxyapatite (HA) is often used as a bone graft because it has biocompatibility, osteoconductive, bioactive, non-toxic, and non-immunogenic properties. HA can be obtained from natural materials such as shells, limestone, eggshells, and others. The nanocrystalline hydroxyapatite (nHA) used in this research is from the *Corbicula moltkiana* shell. **Aim:** to know; a) FTIR characterization of nHA *Corbicula moltkiana*; b) the level of toxicity of *Corbicula moltkiana* nHA on human dermal fibroblast adult cells, and c) the differences in HDFa cell viability between concentration groups of nHA. **Methods:** in vitro laboratory experiment with post-test only control group design. To find out the characterization, use the FTIR characterization test. Toxicity test using the MTT method. The research samples were *Corbicula moltkiana* nHA powder and HDFa cells. The samples were divided into four groups: the control cell group and three groups of nHA *Corbicula moltkiana* with concentrations of 25 µg/ml, 50 µg/ml, and 100 µg/ml. **Result:** a) FTIR shows that *Corbicula moltkiana* nHA has all typical absorption characteristics of HA, b) *Corbicula moltkiana* nHA was not toxic, cell viability at concentrations of 25 µg/ml, 50 µg/ml, and 100 µg/ml against HDFa cells was 99.64%, 96.51%, and 83.93%, respectively, c) There were significant differences in each concentration group. **Conclusion:** *Corbicula moltkiana* nHA was not toxic to HDFa cells therefore this material has the potential to be used as a bone graft

Received (16/02/2025);

Accepted (28/06/2025);

Available online (30/06/2025)

DOI:

<https://doi.org/10.33854/jbd.v12i1>

© Published by Universitas Baiturrahmah Press.
All rights reserved.

Keywords: FTIR characterization, cell viability, nHA *Corbicula moltkiana*, toxicity, HDFa cells

¹Departemen Bedah Mulut dan Maksilofasial, Fakultas Kedokteran Gigi, Universitas Baiturrahmah, Padang, Sumatera Barat, Indonesia

²Departemen Kimia, Fakultas Matematika Dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Andalas, Padang, Sumatera Barat, Indonesia

³Departemen Periodontia, Fakultas Kedokteran Gigi, Universitas Baiturrahmah, Padang, Sumatera Barat, Indonesia

⁴Mahasiswa Program Sarjana, Fakultas Kedokteran Gigi, Universitas Baiturrahmah, Padang, Sumatera Barat, Indonesia

*corresponding author: andriespascawinata@fkg.unbrah.ac.id

PENDAHULUAN

Salah satu cara rekonstruksi tulang alveolar adalah dengan menggunakan *bone graft*, yaitu aplikasi tulang atau material untuk menggantikan

tulang yang rusak. Syarat material di bidang kedokteran gigi, terutama yang digunakan di dalam mulut harus bersifat biokompatibel, yaitu kemampuan suatu material dalam bekerja sama dengan tubuh manusia tanpa menimbulkan efek lain yang berbahaya.¹

Hidroksiapatit (HA) merupakan bahan yang banyak digunakan secara luas pada bidang medis, karena memiliki sifat biokompatibilitas yang baik, osteokonduktif, bioaktif, tidak beracun

dan tidak imunogenik. Penggunaan HA dalam bidang medis cukup luas seperti dalam aplikasi ortopedi, implan tulang dan gigi, pengisi tulang, pelapis bioaktif, perbaikan tulang lunak, persiapan obat/protein/gen, obat anti tumor dan sebagainya.^{2,3,4}

Hidroksiapatit $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ termasuk dalam keluarga kalsium fosfat. Bahan ini dikenal dapat meningkatkan biomineralisasi pada tulang.⁴ Hidroksiapatit juga merupakan salah satu komponen anorganik utama yang ada dalam tulang manusia, namun bahan ini juga dapat dibuat secara sintetik dengan bahan dasar dari alam, seperti batu kapur, cangkang telur, batu karang, serta cangkang kerang dan keong.⁵ Salah satu bahan alami yang potensial digunakan sebagai bahan dasar sintesis HA adalah cangkang kerang pensi (*Corbicula moltkiana*).⁶ Pembuatan hidroksiapatit dari bahan dasar cangkang kerang pensi melalui metode sol gel diketahui dapat menghasilkan struktur kristal berukuran nanometer. Struktur kristal nano (10-100 nm) dari hidroksiapatit diketahui sangat mendukung terjadinya penyembuhan tulang. Bentuk nanokristalin dari hidroksiapatit ini sangat menyerupai bentuk hidroksiapatit alami pada tulang, dan memiliki kontak yang rapat dengan jaringan disekelilingnya, sifat yang dapat diresorpsi dan jumlah molekul yang tinggi pada permukaannya.⁷

Evaluasi biomaterial dapat dilakukan dengan menggunakan uji sitotoksitas untuk mengukur efek toksik bahan terhadap sel dan untuk mengetahui apakah bahan tersebut memenuhi persyaratan penyerapan ke dalam jaringan. Uji sitotoksik adalah uji toksisitas secara

in vitro menggunakan kultur sel yang digunakan untuk mendeteksi adanya aktivitas antineoplastik dari suatu senyawa. Penggunaan uji sitotoksik pada kultur sel merupakan salah satu cara penetapan *in vitro* untuk mendapatkan obat-obat sitotoksik.⁸ Efek toksisitas bahan ditentukan dengan mengukur viabilitas sel pada kultur.⁹

Berdasarkan uraian di atas, penulis tertarik untuk melakukan penelitian karakterisasi FTIR dan uji toksisitas hidroksiapatit nanokristalin *Corbicula moltkiana* (nHA) terhadap Sel *Human Dermal Fibroblast Adult* (HDFa). Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui karakterisasi FTIR dan toksisitas hidroksiapatit nanokristalin *Corbicula moltkiana* terhadap Sel HDFa serta mengetahui perbedaan toksisitas tiap kelompok konsentrasi dari hidroksiapatit nanokristalin *Corbicula moltkiana* terhadap Sel HDFa.

METODE

Jenis penelitian ini adalah eksperimental laboratoris secara *in vitro* dengan rancangan *post-test only control group design*. Sampel yang digunakan adalah bubuk hidroksiapatit nanokristalin *Corbicula moltkiana* (nHA) yang dibuat di Laboratorium Kimia Universitas Andalas Padang dan sel *Human Dermal Fibroblast Adult* (HDFa) yang diperoleh dari Laboratorium *Molecular Medicine and Therapy* Universitas Muhammadiyah Yogyakarta (UMY). Sampel pada penelitian ini dibagi menjadi 4 kelompok perlakuan, yaitu kelompok kontrol sel sebagai kontrol positif dengan persentase sel hidup 100%, kelompok konsentrasi 25 µg/ml, 50 µg/ml dan 100 µg/ml.

Penelitian ini dilaksanakan pada Bulan November 2024 sampai Januari 2025 di Laboratorium Sentral Kimia Universitas Andalas untuk uji karakterisasi *Fourier Transform Infrared Spectroscopy* (FTIR) dan di Laboratorium *Molecular Medicine and Therapy* Universitas Muhammadiyah Yogyakarta (UMY) untuk uji Toksisitas.

Karakterisasi FTIR

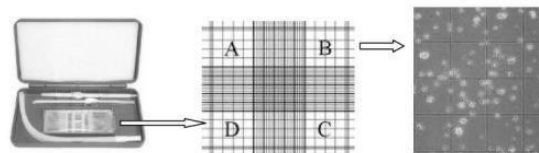
Analisis FTIR dilakukan untuk $A = \pi r^2$ mengidentifikasi gugus fungsi yang terdapat dalam sampel bubuk nHA *Corbicula moltkiana*. Teknik pengukuran FTIR merupakan salah satu metode standar untuk menentukan karakterisasi struktur molekul bahan organik. Prinsip kerja FTIR adalah mendeteksi gugus fungsi senyawa dari absorbansi inframerah yang dilakukan terhadap senyawa tersebut dan pola absorbansi yang dihasilkan oleh setiap senyawa berbeda, sehingga senyawa-senyawa dapat dibedakan serta dikuantifikasikan.¹⁰

Destruksikan sampel yang sudah dalam sediaan serbuk 0,2 mg sampel dibuat pellet dengan menambahkan tambahan 202 mg kalium bromida (KBr), jika sudah sampel dibentuk *pellet* tipis. Kemudian dimasukkan ke dalam tabung perangkat FTIR dan lakukan proses radiasi oleh sinar infra merah dengan rentang bilangan gelombang 4000-400 cm^{-1} .¹¹

Uji Toksisitas

Sel HDFA dipanen setelah sel mencapai pertemuan 80%. Sel diberi enzim tripsin, kemudian diinkubasi selama 3-5 menit. Setelah 5 menit, sel yang belum terlepas dari dasar plate, diberi tripsin lagi. Untuk menonaktifkan tripsin,

tambahkan media kultur 2 ml. Resuspensi sel dengan pipet dan masukkan ke dalam tabung berbentuk kerucut yang berisi 2-3 ml DMEM. Hasil panen sel diambil 10 μl dengan dipipet, dimasukkan dalam Hemositometer untuk dihitung dengan counter.



Gambar 1. Cara perhitungan sel dengan hemositometer

Sel HDFA yang berwarna gelap (mati) dan sel yang terdapat di batas luar atas dan kanan tidak dihitung. Sedangkan sel di batas kiri dan batas bawah dihitung dengan rumus:

$$\text{Jumlah sel terhitung/mL} = \frac{\Sigma \text{ sel kamar A} + \Sigma \text{ sel kamar B} + \Sigma \text{ sel kamar C} + \Sigma \text{ sel kamar D}}{4} \times 10^4$$

Sel HDFA dibuat dalam suspensi sel dengan 2×10^4 sel/180 μl medium kultur. Agar sel fibroblas beradaptasi dan menempel di sumuran, masing-masing tabung 96 celah dimasukkan 180 ml suspensi sel fibroblas. Kemudian, inkubator CO selama 24 jam pada suhu 37°C. Buang media kultur dan cuci sel dengan PBS ke dalam setiap sumuran dengan 100^{-1} media kultur.

Tambahkan nHA *Corbicula moltkiana* dengan konsentrasi 25 $\mu\text{g/ml}$, 50 $\mu\text{g/ml}$, dan 100 $\mu\text{g/ml}$. Inkubasi selama 24 jam di inkubator CO pada suhu 37°C. Media kultur sel dibuang, kemudian cuci dengan PBS dan ditambahkan 10 μl larutan MTT setiap sumuran. Sel diinkubasi kembali selama 4 jam di inkubator CO pada suhu 37°C. Stopper reagent 100 μl yang dibungkus dengan aluminium foil digunakan untuk menghentikan reaksi MTT. Sel HDFA yang hidup terwarnai dengan formazon menjadi ungu,

sedangkan yang mati tidak terbentuk warna ungu. Formazon dibaca absorbansinya secara spektrofotometri menggunakan *Elisa reader* dengan panjang gelombang 570 nm. Semakin pekat warnanya, maka semakin tinggi nilai absorbansinya dan semakin banyak jumlah sel hidup.

Viabilitas sel dapat dihitung dengan rumus:¹²

$$\% \text{ viabilitas sel} = \frac{\text{absorbansi perlakuan} - \text{absorbansi media}}{\text{absorbansi kontrol} - \text{absorbansi media}} \times 100\%$$

Keterangan:

% viabilitas sel: Persentase jumlah kehidupan sel setelah di uji.

Absorbansi perlakuan: Nilai Optical Density (OD) formazan setiap sampel

Absorbansi media: Nilai OD formazan pada rata-rata setiap kontrol media

Absorbansi kontrol: Nilai OD formazan pada rata-rata kontrol sel

Viabilitas sel akan dianalisis berdasarkan klasifikasi menurut beberapa sumber, diantaranya:

- 1) Klasifikasi viabilitas sel menurut Heravi, dkk (2013), sebagai berikut:¹³
 - a. viabilitas sel > 90%: non sitotoksik (biokompatibel)
 - b. viabilitas sel 60-90%: sedikit sitotoksik (toksik ringan)
 - c. viabilitas sel 30-59%: sitotoksik sedang (toksik sedang)
 - d. viabilitas sel < 30%: sangat toksik
- 2) Klasifikasi viabilitas sel menurut Abo, T., dkk (2023), sebagai berikut:¹⁴
 - a. viabilitas sel > 70%: non toksik
 - b. viabilitas sel < 70%: toksik

Analisis Data

Analisis data menggunakan program

statistik SPSS. Uji normalitas data menggunakan uji *Shapiro Wilk*, data berdistribusi normal jika nilai sig.>0,05 (p>0,05). Uji homogenitas menggunakan uji *Levene*, variasi data antar kelompok dikatakan homogen apabila nilai sig.>0,05 (p>0,05). Jika data berdistribusi normal dan homogen, maka akan dilanjutkan dengan uji *One-Way Anova* dan uji LSD (*Least Significant Difference*). Apabila hasil uji *One-Way Anova* didapatkan nilai sig.>0,05 (p<0,05), maka terdapat perbedaan signifikan pada kelompok pengujian, hipotesis alternatif (Ha) diterima dan hipotesis 0 (H0) ditolak, dan untuk melihat kelompok mana yang menunjukkan perbedaan signifikan maka dilanjutkan dengan uji LSD.

HASIL

Penelitian karakterisasi FTIR dan uji toksisitas nHA *Corbicula moltkiana*, mendapatkan hasil seperti berikut.

Karakterisasi FTIR

Hasil uji karakterisasi FTIR bubuk nHA dari *Corbicula moltkiana*, sebagai berikut:

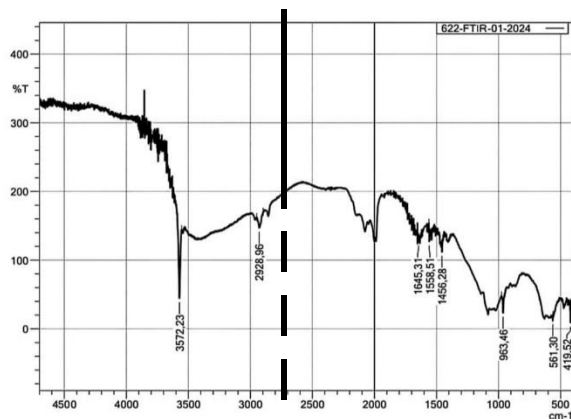
Tabel 1. Spectra FTIR nHA *Corbicula moltkiana*

No.	Gugus Fungsi	Bilangan (Cm ⁻¹)
1	OH	3572,23
2	CO ₃ ²⁻	1456,28
3	PO ₄ ³⁻	963,46 419,52
4	CO	1645,31

Sumber: Hasil Penelitian, 2024

Tabel 1 di atas menunjukkan bahwa nHA *Corbicula moltkiana* menunjukkan terdapat serapan hidroksil OH pada bilangan gelombang daerah 3572,23 cm⁻¹, serapan gugus karbonat CO₃²⁻ pada bilangan gelombang daerah 1456,28

cm^{-1} . Serapan PO_4^{3-} pada rentang bilangan gelombang daerah 963,46 cm^{-1} . Selain itu, ikatan C-O teramati pada bilangan gelombang daerah 1645,31 cm^{-1} .



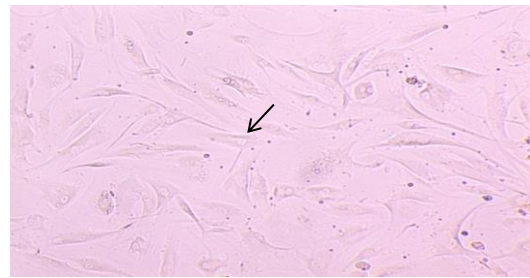
Sumber: Hasil Penelitian, 2024

Gambar 2. Spectra FTIR nHA *Corbicula moltkiana*

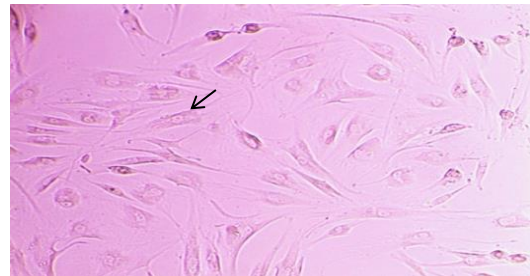
Gambar 2 di atas menunjukkan bahwa nHA *Corbicula moltkiana* memiliki puncak-puncak spesifik pada hidroksiapatit. Gugus fosfat (PO_4^{3-}) merupakan gugus dengan puncak bilangan paling tajam dikarenakan gugus utama hidroksiapatit merupakan gugus fosfat. Kualitas hidroksiapatit dinilai dari perubahan kristalisasi gugus PO_4^{3-} dan OH yang ditentukan berdasarkan ketajaman puncak spektrumnya pada hasil pemeriksaan FTIR.

Hasil Uji Toksisitas

Gambaran mikroskopis sel fibroblas sebelum dan sesudah uji MTT disajikan pada Gambar 3 di bawah.



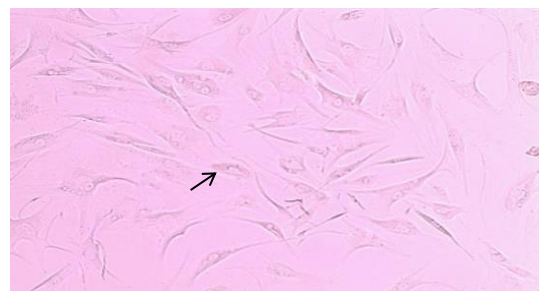
(A)



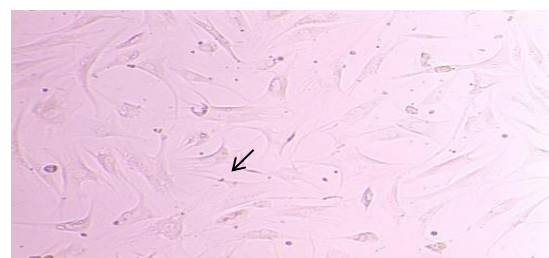
(B)



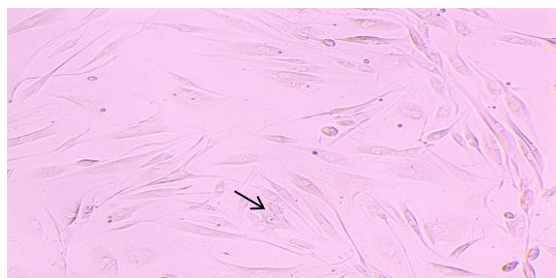
(C)



(D)



(E)



(F)

Gambar 3. Gambaran mikroskopis sel HDFA sebelum dan setelah Uji MTT dengan konsentrasi 25 µg/ml (A, B); 50 µg/ml (C, D); dan 100 µg/ml (E, F).

Gambar 3 dapat dilihat bahwa sebelum uji MTT menunjukkan gambaran khas dari sel fibroblas yaitu memiliki sitoplasma bercabang yang mengelilingi nukleus berbentuk lonjong dengan satu atau dua nukleolus dan menempel pada dasar permukaan *plate* tempat menanam sel tersebut. Setelah dilakukan uji MTT menunjukkan sel hidup yang mampu mereduksi garam MTT menjadi kristal formazan yang berwarna biru, viabilitas sel atau jumlah sel yang hidup terkuantifikasi sesuai dengan kristal formazan yang terbentuk.

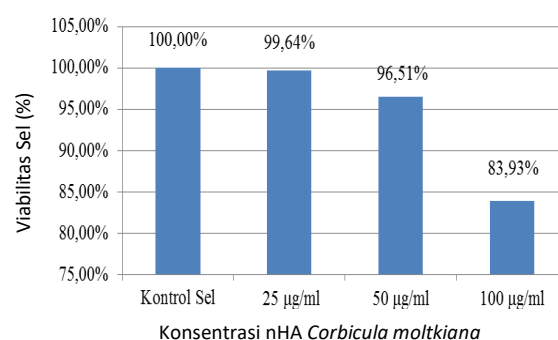
Setelah dilakukan pembacaan hasil dengan *ELISA reader* dan dihitung dengan rumus *optical density* (absorbansi), masing-masing sampel nHA *Corbicula moltkiana* didapatkan nilai rerata (*mean*) absorbansi dan rerata persentase viabilitas sel seperti pada Tabel 2 dan Gambar 4 di bawah.

Tabel 2. Nilai *mean* absorbansi viabilitas sel fibroblas

Konsentrasi	Nilai Mean Absorbansi
Kontrol Media	0.56
Kontrol Sel	2.23
Ekstrak 25 µg/ml	2.22
Ekstrak 50 µg/ml	2.17
Ekstrak 100 µg/ml	1.96

Sumber: Hasil Penelitian, 2024

Tabel 2 menunjukkan bahwa nilai rerata sel fibroblas yang hidup seluruh kelompok perlakuan lebih kecil dari rerata nilai absorbansi kontrol sel. Berdasarkan hasil tersebut, maka konsentrasi yang terbaik untuk digunakan sebagai pembentukan sel fibroblas adalah konsentrasi 25 µg/ml, karena pada konsentrasi tersebut memiliki nilai *mean* mendekati kontrol sel.



Gambar 4. Viabilitas Sel HDFA

Gambar 4 di atas menunjukkan bahwa semakin tinggi konsentrasi nHA *Corbicula moltkiana*, semakin menurun persentase viabilitas sel HDFA, namun semua konsentrasi yang diteliti tidak bersifat toksik terhadap sel HDFA, karena jumlah sel yang hidup lebih dari 70%.¹⁴

Hasil uji *Shapiro Wilk*, data berdistribusi normal ($\text{sig.} > 0,05$) pada semua kelompok konsentrasi. Hasil uji *Levene* didapatkan data homogen ($\text{Sig. } 0,056 > 0,05$). Hasil uji *One-way Anova* diperoleh nilai $\text{Sig. } 0,000 < 0,05$, hal ini berarti perlakuan yang diuji berpengaruh signifikan terhadap viabilitas sel. Hasil uji *LSD* menggambarkan bahwa semua kelompok perlakuan dari

berbagai konsentrasi berbeda signifikan ($p < 0,05$), sehingga hipotesis H_a diterima dan H_o ditolak.

PEMBAHASAN

Hidroksiapatit nanokristalin *Corbicula moltkiana* (nHA) yang dianalisis teridentifikasi memiliki puncak-puncak spesifik pada hidroksiapatit, yaitu puncak bilangan gelombang $3300-3500\text{ cm}^{-1}$, $900-1100\text{ cm}^{-1}$, dan 1600 cm^{-1} .¹⁵ Gugus fosfat (PO_4^{3-}) merupakan gugus dengan puncak bilangan paling tajam, dikarenakan gugus utama hidroksiapatit merupakan gugus fosfat. Kualitas hidroksiapatit dinilai dari perubahan kristalisasi gugus PO_4^{3-} dan OH yang ditentukan berdasarkan ketajaman puncak spektrumnya pada hasil pemeriksaan FTIR, semakin tajam puncak gugus PO_4^{3-} menunjukkan pertumbuhan kristalisasi yang semakin baik (Kadir, 2022). Berdasarkan hasil analisis uji karakterisasi FTIR maka dapat disimpulkan bahwa nHA *Corbicula moltkiana* memiliki semua karakteristik puncak serapan spesifik hidroksiapatit.

Penelitian ini menguji ada atau tidaknya efek toksik nHA dari *Corbicula moltkiana* pada konsentrasi tertentu terhadap sel HDFA, dengan menggunakan metode MTT assay. Efek toksisitas bahan ditentukan dengan mengukur viabilitas sel pada kultur.⁹

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa terdapat perbedaan signifikan toksisitas antara semua kelompok konsentrasi

nHA terhadap sel HDFA. Viabilitas sel tertinggi diperoleh pada konsentrasi $25\text{ }\mu\text{g/ml}$. Hal ini diduga karena mengandung konsentrasi bahan uji yang paling rendah, sehingga kandungan kalsiumnya (Ca^{2+}) juga rendah. Meningkatnya viabilitas sel fibroblas disebabkan rendahnya konsentrasi kalsium (Ca^{2+}) yang masuk ke dalam sel tersebut, sehingga sel memiliki kemampuan untuk melakukan pertahanan sel.¹⁶

Hasil penelitian ini sejalan dengan penelitian Nastiti, dkk (2015) terkait Uji Bioviabilitas Hidroksiapatit dari Cangkang Kerang Darah (*Anadara granosa*) dan penelitian Komala *et al* (2022) terkait Uji Sitotoksitas Hidroksiapatit Cangkang Telur Ayam Ras (*Gallus gallus*) terhadap Sel Fibroblas Ligamen Periodontal Manusia. Kedua penelitian tersebut menyimpulkan bahwa semakin bertambah konsentrasi nHA semakin menurun persentase sel hidup.

Gambar 4 menunjukkan bahwa semakin tinggi konsentrasi nHA *Corbicula moltkiana*, semakin menurun persentase viabilitas sel HDFA, namun meskipun demikian semua konsentrasi nHA yang diteliti tidak bersifat toksik terhadap sel HDFA, karena jumlah sel yang hidup lebih dari 70%.¹⁴

Berdasarkan hasil tersebut dapat disimpulkan bahwa nHA dari *corbicula moltkiana* bersifat biokompatibel terhadap sel HDFA dan berpotensi digunakan sebagai bahan *bone graft* untuk mengatasi kecacatan tulang.

SIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian ini, dapat disimpulkan bahwa nanopartikel hidroksiapatit (nHA) yang disintesis dari *Corbicula moltkiana* memiliki karakteristik puncak serapan spesifik hidroksiapatit berdasarkan uji FTIR. Selain itu, nHA *Corbicula moltkiana* terbukti bersifat biokompatibel dan tidak toksik terhadap sel kultur HDFa dengan viabilitas sel di atas 70% pada semua kelompok konsentrasi yang diuji. Penelitian ini juga menunjukkan adanya pengaruh signifikan tingkat konsentrasi nHA *Corbicula moltkiana* terhadap viabilitas sel HDFa, sehingga mendukung potensi penggunaan material ini sebagai kandidat bahan biomaterial yang aman untuk aplikasi biomedis.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terimakasih kami sampaikan kepada drg. Arya Adiningrat, Ph.D di lab MMT UMY yang telah membantu proses penelitian dan memberikan fasilitas dalam penelitian ini.

REFERENSI

1. Dala, Y. N. Sintesis Dan Karakterisasi Hidroksiapatit (Hap) dari Limbah Cangkang Kerang Lokan (*Batissa Violecea L*) dengan Metode Basah Presipitasi. *Jurnal Dinamika Sains*. 2018; 2 (1) p. 69.
2. Dewi, A.H. Ana, I, D. The use of hydroxyapatite bone substitute grafting for alveolar ridge preservation, sinus augmentation, and periodontal bone defect: A systematic review. *Heliyon*. 2018; 4 (10) p. 1-30
3. Yonatasya, F. D., Prananingrum, W., & Ashrin, M. N. Pengaruh Bone Graft Senyawa Kalsium Hasil Sintesis Cangkang Kerang Darah (*Anadara granosa*) dengan Variasi Waktu Sintering terhadap Proliferasi Sel Fibroblas pada Proses Socket Healing. *Denta*. 2019; 13(1), p. 34-43.
4. Kavasi, R. M., Coelho, C. C., Platania, V., Quadros, P. A., & Chatzinikolaidou, M. In vitro Biocompatibility Assessment of Nanohydroxyapatite. *Nanomaterials*. 2021; 11(5) p.1-15.
5. Gibson, I. R. Natural and Synthetic Hydroxyapatites. Academic Press. 2020; p. 307-317
6. Alif, M., Aprillia, W., Arief, S. A hydrothermal synthesis of natural hydroxyapatite obtained from *Corbicula moltkiana* freshwater clams shell biowaste. *Material letters*. 2018; 230 p. 40-43
7. Pascawinata, A., Labanni, A., Revilla, G. Increased Number of Osteoblasts and New Bone Formation in Rat's Tooth Socket Implanted with Nanocrystalline Hydroxyapatite from Pensi Shells. *Journal of International Dental and Medical Research*. 2023; 16 (4) p. 1555-1561
8. Haryoto, Muhtadi, Indrayudha, P., Azizah, T., Suhendi, A., & Haryoto, Muhtadi, Peni Indrayudha, Tanti Azizah, A. S. Aktivitas Sitotoksik Ekstrak Etanol Tumbuhan Sala (*Cynometra ramiflora Linn*) terhadap Sel HeLa, T47D dan WiDR. *Jurnal Penelitian Saintek*. 2013; 18 p. 21-28.
9. Rahayu, Y. C., Triwahyuni, I. E., Kusumawardani, B., & Sari, D. Y. The Cytotoxic and Proliferative Activity of Cocoa Pod Husk Extract (*Theobroma Cacao L.*) on Periodontal Ligament Fibroblasts. *ODONTO: Dental Journal*. 2022; 9(1) p. 46.
10. Maryam, S., Effendi, N., & Kasmah, K. Produksi dan Karakterisasi Gelatin dari Limbah Tulang Ayam dengan Menggunakan Spektrofotometer FTIR (*Fourier Transform Infra Red*). *Majalah Farmaseutik*. 2019; 15(2) p. 96.
11. Gago, J., & Ngapa, Y. D. Pemanfaatan Cangkang Telur Ayam sebagai Material Dasar dalam Sintesis Hidroksiapatit dengan Metode Presipitasi Basah. *Cakra Kimia (Indonesia E-Journal of Applied Chemistry)*. 2021; 9(1)
12. Komala, D., Amin, M. N., & Rahayu, Y. C. Uji Sitotoksitas Hidroksiapatit Cangkang Telur Ayam Ras (*Gallus gallus*) terhadap Sel Fibroblas Ligamen Periodontal Manusia. *Stomatognatic-Jurnal Kedokteran Gigi*. 2022; 19 (1) p. 49.
13. Heravi F, Ramezani M, Poosti M, Hosseini M, Shajiei A, Ahrari F. In Vitro Cytotoxicity Assessment of an Orthodontic Composite Containing Titanium-dioxide Nano- particles. *Journal of Dental Research, Dental Clinics, Dental Prospects*. JODDD. 2013; 7(4) p.192-8.doi:10.5681/joddd.
14. Abo T, Deguchi Y, Yuki T, Takashi Y, Miyaawa M, Sakaguchi H. Evaluation of MTT Reducers and Strongly Colored Substances In The Short Time Exposure test Method For Assesing Eye Irritation Potential. *The Journal of Toxicological Science*. 2023;48(6) p. 363-374
15. Jamarun N, Miftahurrahmi, Septiani U. Synthesis of hydroxyapatite from Halaban Limestone by Sol-Gel method. *Research Journal of Pharmaceutical*,

- Biological and Chemical Sciences. 2016; 7(5)
p.2956-2961
16. Nastiti AD, Laihad FM. Bioviabilitas hidroksiapatit ekstrak cangkang kerang darah (*Anadara granosa*) terhadap sel punca mesenkimal sebagai bahan graft Tulang. *Denta*. 2015;9(2):122-8.