

LAPORAN PENELITIAN

Bioviabilitas Ekstrak *Gracilaria sp* terhadap Stem Sel Mesenkimal sebagai Terapi Adjuvant Periodontitis

*(The Bioviabilitas of Gracilaria sp Extract Againsts
Mesenchymal Stem Cell as Adjuvant Therapy of Periodontitis)*

Talsha Irzaputri A*, Yoifah Rizka **, Sarianofern***

*Kedokteran Gigi Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Hang Tuah

**Periodonsia Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Hang Tuah

***Radiologi Kedokteran Gigi Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Hang Tuah

ABSTRACT

Background: *Gracilaria* Seaweed extracts are known to have an antibacterial content that can inhibit the growth of *Porphyromonas gingivalis* bacteria. *P. gingivalis* are dominant in chronic periodontitis as a cause of periodontal tissue damage that can be inhibited by using materials that contain antibacterial effect. Terms of materials to be applied in the oral cavity must be biocompatible, through toxicity tests, one with bioviability test. In this study bioviability test performed on media mesenchymal stem cells. **Purpose:** To determine bioviability *Gracilaria* seaweed extract against mesenchymal stem cells as adjuvant therapy of periodontitis. **Materials and Methods:** study design was post test only control group design. Mesenchymal stem cells in 96 wells were divided into a control group of cells (n=6), media controls (n=6), and treatment (n=6). The treatment group was given *Gracilaria* seaweed extract with a concentration of 2.5%, 5%, 10%, 20% and 40%. Stem cells were incubated 24 hours before and after treatment. Once given MTT, optical density read with an ELISA reader then calculated the percentage of living cells. Toxic material when living cells <50% and not toxic when living cells >50%. Living cell data were analyzed by statistical test Kruskal Wallis and Man Whitney. **Result:** Viability cell at 2.5% concentration is 68.59%, 5% concentration = 29.67%, 10% concentration = 4.43%, 20% concentration = 2.5% and 40% concentration = 0.96 %. **Conclusion:** Extract of seaweed *Gracilaria* proven not toxic at 2.5% concentration and proved toxic at 5%, 10%, 20% and 40% concentration

Keywords: Bioviability, *Gracilaria sp*, mesenchymal stem cell

Correspondence: Yoifah Rizka, Department of Periodontology, Faculty of Dentistry, Hang Tuah University, Arif Rahman Hakim 150, Surabaya, Phone 031-5912191, Email: yoi.riez@yahoo.co.id

ABSTRAK

Latar belakang: Ekstrak rumput laut *Gracilaria* diketahui memiliki sifat antibakteri yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Porphyromonas Gingivalis*. *P.Gingivalis* dominan pada periodontitis kronis sebagai penyebab kerusakan jaringan periodontal yang dapat dihambat dengan menggunakan bahan yang mengandung efek anti bakteri. Syarat bahan untuk dapat diaplikasikan dalam rongga mulut harus bersifat biokompatibel, melalui uji toksisitas, salah satunya dengan uji bioviabilitas. Pada penelitian ini uji bioviabilitas dilakukan pada media stem sel mesenkimal. **Tujuan:** Untuk mengetahui bioviabilitas ekstrak rumput laut *Gracilaria* terhadap stem sel mesenkimal sebagai terapi adjuvant periodontitis. **Bahan dan Metode:** Rancangan penelitian adalah post test only control group design. Stem sel mesenkimal dalam 96 sumuran dibagi menjadi kelompok kontrol sel ($n=6$), kontrol media ($n=6$), dan perlakuan ($n=6$). Kelompok perlakuan diberi ekstrak rumput laut *Gracilaria* dengan konsentrasi 2,5%, 5%, 10%, 20% dan 40%. Stemsel diinkubasi 24 jam sebelum dan sesudah perlakuan. Setelah diberi MTT, optical density dibaca dengan ELISA reader lalu dihitung persentas sel yang hidup. Bahan bersifat toksik bila sel hidup $<50\%$ dan tidak toksik bila sel hidup $>50\%$. Data sel yang hidup tersebut dianalisa dengan uji statistik Kruskal wallis dan Man Whitney. **Hasil:** Viabilitas sel pada konsentrasi 2,5% adalah 68,59%, konsentrasi 5% = 29,67%, konsentrasi 10% = 4,43%, konsentrasi 20% = 2,5% dan konsentrasi 40% = 0,96%. **Simpulan:** Ekstrak rumput laut *Gracilaria* terbukti tidak toksik pada konsentrasi 2,5% dan terbukti toksik pada konsentrasi 5%, 10%, 20% dan 40%.

Keywords: Bioviabilitas, *Gracilaria sp*, stem sel mesenkimal

Korespondensi: Yoifah Rizka W, Bagian Periodonsia Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Hang Tuah, Arif Rahman Hakim 150, Surabaya, Telepon 031-5912191, Email: yoi.riez@yahoo.co.id

PENDAHULUAN

Penyakit periodontal merupakan masalah kesehatan gigi dan mulut yang masih dialami masyarakat awam. Di Surabaya khususnya, dari 59 puskesmas terjadi 2,98% kasus pada tahun 2011 (Diskes Surabaya, 2011). Hal ini disebabkan oleh kurangnya tingkat kesadaran menjaga kebersihan rongga mulut. Periodontitis merupakan peradangan pada jaringan periodontal yang disebabkan oleh mikroorganisme spesifik. Salah satu klasifikasi periodontitis ialah periodontitis kronis. Periodontitis kronis merupakan bentuk yang paling umum dari periodontitis, yang disebabkan oleh bakteri plak, salah satu bakteri yang paling banyak ditemui pada periodontitis kronis adalah *Porphyromonas gingivalis*.¹

Terapi periodontal dapat dilakukan dengan cara bedah dan non-bedah. Terapi non-bedah merupakan prosedur perawatan periodontal yang bertujuan untuk menghilangkan faktor penyebab dan faktor yang dapat menambah keparahan penyakit gingiva dan periodontal dengan kontrol plak, *scaling*, *root planing*, dan pemberian antimikroba atau antibiotik.¹

Terapi alternatif pada penyakit periodontal perlu dilakukan sebab terapi mekanis yaitu *scaling* dan *root planing* saja dianggap belum berhasil untuk menghilangkan jumlah koloni bakteri spesifik, sehingga diperlukan pemberian antibiotik sistemik atau lokal.² Penggunaan antibiotik jangka panjang dapat menimbulkan beberapa efek hipersensitivitas, reaksi toksik, dan banyak bakteri yang resisten

terhadap antibiotik,³ yang mengakibatkan keterbatasan penggunaannya dalam terapi sehingga diperlukan obat alternatif untuk terapi penyakit periodontal yang memiliki efek antibakteri yang tidak menimbulkan efek samping bagi penderita dengan penggunaan jangka panjang dan dapat langsung bekerja pada daerah sasaran.

Dalam bidang medis, pengobatan bisa didapat dari berbagai macam jenis sumber daya hayati salah satunya adalah *Gracilaria sp.* yang merupakan salah satu jenis dari rumput laut. *Gracilaria* termasuk golongan alga merah (*Rhodophyceae*) yang banyak dimanfaatkan dan bernilai ekonomis.⁴ Menurut penelitian Siregar, (2012) ekstrak *Gracilaria* memiliki kandungan senyawa bioaktif antibakteri yaitu alkaloid, flavonoid dan steroid yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus epidermidis*. Melki, (2011) membuktikan bahwa ekstrak *Gracilaria* dapat menghambat pertumbuhan bakteri *E.coli* dan *S.aureus* pada konsentrasi 0,05%, 1%, 5%, 10%, dengan konsentrasi hambat minimum 0,05%.⁵ Penelitian oleh Talib (2014) membuktikan bahwa ekstrak rumput laut *Gracilaria sp* dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Porphyromonas gingivalis* pada konsentrasi 0,05%, 1%, 5%, 10%, yang menunjukkan semakin besar konsentrasi ekstrak *Gracilaria* semakin besar daya hambatnya terhadap bakteri *Porphyromonas gingivalis*.⁶

Ekstrak rumput laut *Gracilaria* ini mempunyai potensi untuk dikembangkan sebagai terapi adjuvant pada kelainan periodontal, namun untuk dapat diaplikasikan di dalam

rongga mulut suatu bahan kedokteran gigi harus di uji toksik terlebih dahulu. Bahan-bahan kedokteran gigi harus *biokompatibel* yaitu tidak memiliki efek toksik atau efek merugikan pada fungsi biologis.⁷ Uji viabilitas sel merupakan bagian dari uji toksisitas yang digunakan untuk mengetahui kemampuan suatu bahan kimia, toksin natural, dan sel mediator imun untuk membunuh suatu sel.^{8 9} Pengkajian toksisitas suatu zat diperlukan untuk menetapkan potensi suatu zat sebagai racun.¹⁰ Maka penelitian ini merupakan penelitian lanjutan untuk melihat jumlah sel yang hidup dari pemberian ekstrak *Gracilaria*.

Uji bioviabilitas dilakukan pada *mesenchymal stem cells*. *Mesenchymal stem cells* dapat digunakan untuk menguji obat baru dan untuk menguji toksisitas,¹¹ sebab stem sel mesenkimal bersifat belum berdiferensiasi (*undifferentiated*), mampu berproliferasi (*self renewal*) dan dapat berdiferensiasi menjadi sel-sel tubuh yang dibutuhkan.¹²

Berdasarkan penelitian Talib (2014) didapatkan zona hambat terhadap bakteri *Porphyromonas gingivalis* yaitu 7,372mm (0,05%), 7,95mm (1%), 11,57mm (5%), dan 13,86mm (10%).⁶ Dibandingkan dengan kontrol positif (tetrasiklin) yaitu 40,868 mm. Hal tersebut menunjukkan kecenderungan bahwa semakin besar konsentrasi ekstrak *Gracilaria* maka semakin besar daya hambatnya terhadap bakteri *Porphyromonas gingivalis*. Oleh karena itu peneliti menggunakan konsentrasi mulai 2,5%, 5%, 10%, dan ditingkatkan menjadi 20%, dan 40%, konsentrasi tersebut didapat dari pengenceran dua kalilipat dan diharapkan agar hasil dari konsentrasi tersebut dapat mendekati kontrol

positif (tetrasiklin) dan semakin menghambat pertumbuhan bakteri *Porphyromonas gingivalis*. Hasil penelitian ini diperlukan untuk mengetahui efek toksik yang mungkin ada dalam *Gracilaria*, jika *Gracilaria* terbukti aman dan tidak menimbulkan efek toksik pada jaringan yang normal, maka ekstrak *Gracilaria* dapat dikembangkan sebagai bahan alternatif terapi pada pengobatan penyakit periodontal.

BAHAN DAN METODE

Penelitian pembuatan ekstrak *Gracilaria* dilakukan di Laboratorium fitokimia Fakultas Farmasi Universitas Surabaya (UBAYA) dan perlakuan terhadap *mesenchymal stem cells* dilakukan di Laboratorium *stem cell* di *Institute of Tropical Disease Centre* Universitas Airlangga Surabaya. Rumput laut jenis spesies *Gracilaria* dikeringkan dibawah panas matahari selama 4 hari dengan suhu yang stabil. Sampel yang telah kering (*simplisia*) dipotong-potong kemudian dihaluskan dengan menggunakan blender hingga menjadi serbuk *simplisia*. *Simplisia* ditimbang sebanyak 50 gram dan dimasukkan ke dalam tabung elenmeyer. Lalu dilakukan perendaman (*macerasi*) dengan larutan metanol 70% sebanyak 100ml dan direndam selama 2 hari. Larutan disaring menggunakan kertas saring dan dikeringkan di atas pemanas listrik hingga terbentuk ekstrak kental. Media *mesenchymal stem cells* dalam 96 sumuran dibagi menjadi kelompok kontrol sel ($n=6$), kontrol media ($n=6$), dan perlakuan ($n=6$). Kelompok sel merupakan sedian dari *mesenchymal stem cells* dan kelompok media merupakan sediaan *alpha MEM*,

kelompok perlakuan diberi ekstrak rumput laut *Gracilaria* dengan konsentrasi 2,5%, 5%, 10%, 20% dan 40%, konsentrasi tersebut didapat dari pengenceran dengan media *alpha MEM*. Kemudian dilakukan uji bioviabilitas dan dibaca nilai absorbansinya secara spektrofotometri menggunakan *ELISA reader* pada panjang gelombang 620 nm. Nilai *optical density* (absorbansi) masing-masing sampel pada setiap konsentrasi terhadap nilai kontrol dilakukan perhitungan nilai rata-rata presentase sel-sel yang hidup.

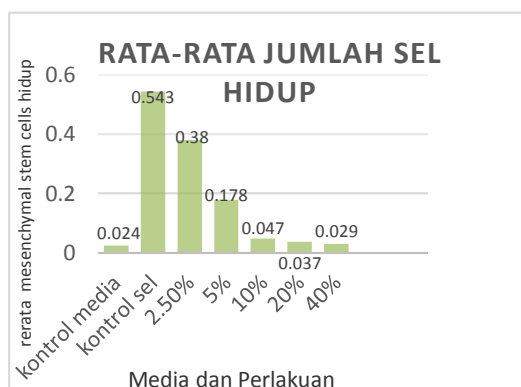
HASIL

Data viabilitas sel dari ekstrak *Gracilaria* terhadap stem sel mesenkimal berdistribusi tidak normal (uji *Shapiro-Wilk* didapatkan $p>0.05$) dan antar kelompok memiliki variansi yang tidak homogen (*Levene's test* $p=0.000$), data tidak berdistribusi secara tidak normal sehingga dilakukan uji non parametrik yaitu *Kruskal Wallis* dengan hasil $p<0,05$ yang menunjukkan bahwa ada perbedaan viabilitas sel yang bermakna antar kelompok perlakuan. Untuk melihat perbedaan viabilitas sel pada masing-masing kelompok, data kelompok perlakuan dilakukan uji *Man Whitney* dengan pemaknaan $p<0,05$ menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang bermakna antar kelompok media dengan semua kelompok perlakuan, kelompok sel dengan kelompok konsentrasi 2,5%; 5%; 10%, konsentrasi 20% dengan semua perlakuan, konsentrasi 5% dengan semua perlakuan, konsentrasi 10% dengan 40%, dan konsentrasi 20% dengan 40% ($p= 0,004$). Dari hasil perhitungan *ELISA Reader*

didapatkan pengukuran jumlah sel yang hidup dari konsentrasi 2,5%, 5%, 10%, 20%, 40% menunjukkan hasil rerata jumlah sel hidup 0,379, 0,179, 0,04, 0,036, 0,028, dan didapatkan hasil presentase jumlah sel hidup dari perhitungan dengan menggunakan rumus viabilitas sel yaitu 68,59%, 29,67%, 4,43%, 2,5% dan 0,96%. Dari presentase jumlah sel yang hidup dapat dikatakan semakin tinggi presentase konsentrasi ekstrak *Gracilaria* semakin rendah jumlah sel hidup.

Tabel 1. Tabel Hasil uji statistik deskriptif

Kelompok	N	Rata-Rata	Std. Deviasi
P1	6	0,543	0,027
P2	67	0,024	0,003
P3	6	0,380	0,0029
P4	6	0,178	0,014
P5	6	0,047	0,005
P6	6	0,037	0,04
P7	6	0,029	0,005



Gambar 2. Grafik rata-rata Viabilitas Sel

PEMBAHASAN

Penyakit periodontal merupakan suatu respon inflamasi karena adanya infeksi bakteri pada jaringan pendukung gigi yang melekat lama pada jaringan periodontal sehingga terbentuk *biofilm* plak.¹³ Periodontitis merupakan peradangan pada jaringan periodontal yang disebabkan oleh mikroorganisme spesifik. Salah satu klasifikasi periodontitis adalah periodontitis kronis. Periodontitis kronis merupakan bentuk yang paling umum dari periodontitis, yang disebabkan oleh bakteri plak, salah satu bakteri yang paling banyak ditemui pada periodontitis kronis adalah *Porphyromonas gingivalis*.¹

Eliminasi bakteri penyebab mencakup kontrol plak, *scaling*, *root planing*, dan pemberian antibiotika. Pemberian antibiotika perlu dilakukan karena perawatan secara mekanis yaitu *scaling* dan *root planing* dikatakan belum berhasil karena terdapat mikroorganisme spesifik. Antibiotika dapat menjadi terapi tambahan pada terapi mekanik periodontal,¹⁴ namun penggunaan antibiotik jangka panjang dapat menimbulkan beberapa efek hipersensitivitas, reaksi toksik, dan dengan banyaknya bakteri yang resisten terhadap antibiotik,³ sehingga pada penelitian ini dipilih ekstrak *Gracilaria* sebagai terapi tambahan untuk mengurangi efek resistensi dari antibiotik karena ekstrak *Gracilaria* tersebut memiliki sifat antibakteri.

Gracilaria memiliki komponen kimia yaitu karbohidrat, protein, lemak, serat kasar, abu, mineral yang meliputi kalsium, fosfor, natrium dan zat besi. Selain itu terdapat vitamin B1, B2 dan Vitamin C.¹⁶ Selain itu pada rumput laut *Gracilaria* memiliki kandungan karoten, dimana karotenoid

memiliki fungsi biologis yang sangat penting sebagai antioksidan, dan imunostimulator yang dapat mencegah penyakit, anti-inflamasi, anti stres, anti penuaan diri, dan pelindung kulit dari sinar ultraviolet. *Gracilaria* juga memiliki kemampuan menangkap radikal bebas atau antiradikal¹⁷. *Gracilaria* memiliki kandungan senyawa bioaktif antibakteri yaitu alkaloid, flavonoid, dan steroid yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus epidermidis*.¹⁸

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah *mesenchymal stem cells*. *Stem cell* adalah sel yang menjadi awal mula dari pertumbuhan sel lain yang menyusun keseluruhan tubuh organisme, termasuk manusia.¹² Teknik jaringan menggunakan *mesenchymal stem cells* adalah pilihan terapeutik dengan beberapa keunggulan, *Mesenchymal stem cells* memiliki kualitas regenerasi tinggi jaringan yang rusak tanpa membentuk jaringan fibrous dan resiko rendah terhadap penolakan autoimun, *mesenchymal stem cells* dapat berdiferensiasi menjadi mesodermal, endodermal, dan ektodermal, oleh karena itu *mesenchymal stem cells* merupakan sumber daya yang baik untuk rekayasa jaringan.¹⁵ *mesenchymal stem cells* merupakan sel yang multipoten sehingga dapat berdiferensiasi menjadi golongan yang sama dan dapat berdiferensi menjadi penyusun jaringan periodontal.¹²

Penelitian ini menggunakan uji bioviabilitas yang merupakan bagian dari uji toksisitas yang digunakan untuk mengevaluasi secara biologi efek suatu material kedokteran gigi yang diperlukan secara langsung terhadap jaringan dalam kultur sel untuk prosedur skrining standar yang

direkomendasikan yang menjadi perhatian utama pada sifat iritasi lokal.⁹ Uji toksisitas ialah uji untuk menentukan suatu bahan memiliki potensi menjadi toksik pada organisme biologis dan sejauh mana efeknya.¹⁹

Pada hasil penelitian menunjukan bahwa terdapat perbedaan signifikan dari jumlah sel yang hidup antara kelompok perlakuan kecuali kelompok kontrol sel dengan konsentrasi 2,5% dan 40% ini disebabkan karena ekstrak *Gracilaria* memiliki kandungan beberapa bahan aktif yaitu senyawa alkaloid, flavonoid yang bersifat sitotoksik, dimana semakin tinggi konsentrasi maka semakin banyak kandungan alkaloid dan flavonoid yang terdapat pada *Gracilaria* dan menyebabkan rendahnya jumlah sel yang hidup.

Senyawa alkaloid memiliki efek farmakologi pada manusia dan hewan sebagai zat antibakteri. Ini disebabkan karena alkaloid mempunyai kemampuan dalam menghambat biosintesis dinding sel, hal ini dapat mengakibatkan metabolisme bakteri terganggu. Dan juga dapat merusak komponen penyusun peptidoglikan pada sel bakteri, sehingga menyebabkan kematian sel bakteri pada sel tersebut.²⁰ Senyawa alkaloid dapat menyebabkan DNA *intercalase* yang akan menghambat proses transkripsi dan replikasi DNA serta proses proliferasi sel dan akhirnya menyebabkan kematian sel,²¹ senyawa flavonoid memiliki kemampuan menghambat pertumbuhan bakteri dengan beberapa mekanisme yang berbeda, antara lain flavonoid menyebabkan terjadinya kerusakan permeabilitas dinding bakteri, mikrosom, dan lisosom sebagai hasil interaksi antara flavonoid dengan DNA bakteri, mekanisme lainnya yaitu

gugus hidroksil yang terdapat pada struktur senyawa flavonoid menyebabkan perubahan komponen organik dan transpor nutrisi yang akhirnya akan mengakibatkan timbulnya efek toksik terhadap bakteri.²² Senyawa flavonoid dapat menghambat aktivitas DNA topoisomerase di dalam nukleus. Topoisomerase yang dihambat dapat menyebabkan proses replikasi, transkripsi, rekombinasi DNA terhambat. Hal ini menyebabkan proliferasi sel terhambat dan akan menyebabkan kematian sel.^{23, 24}

Dengan demikian dapat disimpulkan bahwa ekstrak *Gracilaria* dengan konsentrasi 2,5% tidak memiliki sifat toksik terhadap stem sel mesenkimal dan bersifat toksik pada konsentrasi 5%, 10%, 20%, 40%. Hal ini menunjukkan kecenderungan bahwa semakin tinggi konsentrasi semakin banyak kandungan alkaloid dan flavonoid, sehingga mengakibatkan semakin besar pula efek toksik terhadap stem sel mesenkimal yang menyebabkan rendahnya viabilitas sel.

SIMPULAN

Ekstrak *Gracilaria* memiliki bioviabilitas terhadap *mesenchymal stem cell* pada konsentrasi 2,5%, dan tidak memiliki bioviabilitas terhadap *mesenchymal stem cells* pada konsentrasi 5%, 10%, 20%, dan 40%.

DAFTAR PUSTAKA

1. Newman MG, Takei HH, Klokkevoid PR, Carranza FA. 2012. Clinical Periodontology, 11th edition. St. Louis: Saunders. p. 484-483, 238-236, 205-194, 38-3.
2. Krismariono A. 2005. Perawatan Infeksi Periodontal dengan Pemberian Antibiotika secara Lokal. Jurnal PDGI, 55: 38-37.
3. Manson JD, Eley BM. 2012. Buku Ajar Periodonti. Jakarta: Hipokrates. p. 49-44.
4. Ghufuran MH, Kordi. 2010. A to Z Budidaya Biota Akuatik untuk Pangan, Kosmetik, dan Obat-obatan. Yogyakarta: ANDI. p. 65-63.
5. Melki, dkk. 2011. Uji Antibakteri Ekstrak *Gracilaria* sp. (Rumput Laut) Terhadap Bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*. Jurnal Program Studi Ilmu Kelautan FMIPA Universitas Sriwijaya, Indralaya-Indonesia. Available from http://eprints.unsri.ac.id/1257/2/Melki_ujiantibakteriekstrakGracilariasp.pdf. Diakses 24 Maret 2014.
6. Talib AW. 2014. Daya Hambat Ekstrak Rumput Laut Spesies *Gracilaria* Terhadap Pertumbuhan Bakteri *Porphyromonas gingivalis*. Skripsi, Fakultas Kedokteran Gigi Hang Tuah, Surabaya. H. 45-44,37.
7. Anusavice K.J. 2004. Philips Buku Ajar Ilmu Bahan Kedokteran Gigi. Jakarta: EGC. p. 66-64.
8. Rode. 2008. Apoptosis, Cytotoxicity and Cell Proliferation, 4th ed. Roche Diagnostics GmbH. p. 90. Available from https://lifescience.roche.com/wcsstore/RASCatalogAssetStore/Articles/05242134001_05.08.pdf. Diakses 30 Maret 2014.
9. Yuliati A. 2005. Viabilitas Sel Fibroblas BHK-21 Pada Permukaan Resin Akrilik Rapid Heat Cured. Majalah Kedokteran Gigi. (Dent. J.), 38(2): 72-68. Available from: <http://journal.unair.ac.id/filerPDF/DENTJ-38-2-06.pdf>. Diakses 14 April 2014.
10. Murtini JT, dkk. 2010. Uji Toksisitas Sub Kronik *Spirulina platensis* Secara In-Vivo: Jurnal Pascapanen dan Bioteknologi Kelautan dan Perikanan, 5(2). Available from http://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&ved=0CCUQFjAA&url=http%3A%2F%2Fwww.sidik.litbang.kkp.go.id%2Findex.php%2Fsearchkatalog%2FdownloadDataById%2F2038%2F5-Jovita_Tri_M.pdf&ei=MgWCU5eSJ8no8AXV8IK4BA&usq=AFQjCNE9u Cm2ilBiPxM3yUNRXxDi-PRZfQ&bvm=bv.67720277,d.dGc. Diakses 14 Mei 2014.

11. Wobus AM, Loser P. 2011. Present State and Future Perspectives of Using Pluripotent StemCells In Toxicology Research. Available from:http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3026927/pdf/204_2010_Article_641.pdf. Diakses 21 Maret 2014.
12. Halim D, dkk. 2010. STEM CELL- Dasar Teori & Aplikasi Klinis. Jakarta: Erlangga. p. 13-4,35-30.
13. Nield-Gehrig, Willmann DE. 2003. Foundation of Periodontics for the dental hygienist, USA; Lippincott William and Wilkins. p. 258-256, 38-34,26-30.
14. Perry DA, Beemsterboer PL. 2007. Periodontology For The Dental Higienist, ed 3.p.262-259, 202-203.
15. Mitrano TI, Grob MS, Carrion F, Lampeti EN, Luz PA, Fierro FS, Quintero A, Chapparo A, Sanz A. 2010. Culture and Characterization of Masenchymal Stem Cells From Human Gingival Tissue. Journal of Periodontology Online, 81(6): 917-25.
16. Hijaz MN, 2009. Uji Aktivitas Antioksidan Karaginan Dalam Alga Merah Jenis *Eucheuma spinosum* dan *gracillaria verrucosa*. Skripsi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Negeri Islam Malang. h.28-29. Available from: <http://lib.uin-malang.ac.id/files/thesis/fullchapter/04530016.pdf> accessed April 9, 2014
17. Julyasih SM, Wirawan I.G.P, Harijani W, Widajati W, 2009. Aktivitas Antioksidan Beberapa Jenis Rumput Laut (Seaweeds) Komersial Di Bali.Seminar Nasional Fakultas Pertanian Universitas Udayana. Available from: <http://eprints.upnjatim.ac.id/3929/1/K. Sri Marhaeni Julyasih, I.G.P Wirawan, Wiwik Sri Harijani, dan Wiludjeng Widajati.pdf> accessed March 23, 2014
18. Siregar AF, dkk, 2012. Potensi Antibakteri Ekstrak Rumput Laut Terhadap Bakteri Penyakit Kulit *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus epidermidis*, dan *Micrococcusluteus*.Journal Of Marine Research. Volume 1, Nomor 2,h.152-160 Available at http://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=3&ved=0CDQQFjAC&url=http%3A%2F%2Fportalgaruda.org%2Fdownload_article.php%3Farticle%3D74644%26val%3D4716&ei=RyIwU7S0EsWHRQeV3YHQDg&usg=AFQjCNG3gtAzHifzXJIoLmmJqW2A3YGE4g&sig2=Pn1XxO3RWCv_jm1z_vUpbg&bvm=bv.62922401,d.bmk accessed March 24,2014
19. Leusch F, Chapman H, 2011. The role of toxicity testing in identifyingtoxic substances: A framework for identification of suspected toxic compounds in water. Report. Pp. 7. Griffith University. Available from: http://www.dhhs.tas.gov.au/_data/assets/pdf_file/0007/78136/Griffith_University_-_ToxicityTesting_Report.pdf accessed May 16, 2014
20. Gunawan SG, Setiabudy R, Nafrialdi, Elysabeth. 2009. Farmakologi dan Terapi Edisi 5. Jakarta: Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, h. 585
21. Rozenkranz V, Wink M. 2007. Induction of apoptosis by alkaloids, non-protein amino acids, and cardiac glycosides in human promyelotic HL-60 cells. Institute fur Pharmazie and Molekulare Biotechnologic, Univercity Heidelberg, Germany. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17708454> Diakses 5 Juni 2014.
22. Sabir A. 2005. Aktivitas Antibakteri Flavonoid Propolis *Trigona* sp terhadap Bakteri *Streptococcusmutans* (in vitro). *Majalah KedokteranGigi (Dent J)* 38:135-141. Available from: <http://herbalnet.healthrepository.org/bitstream/123456789/2653/1/uji%20anti%20bakteri%20trigona.pdf> accessed March 20, 2014
23. Sukadirman, Ekasari W, Hapsari PP. 2006.Aktivitas Antikanker dan Induksi Apoptosis Fraksi Kloroform Daun Pepaya (*Carica papaya* L) terhadap Kultur Sel Kanker Mieloma. *Media Kedokteran Hewan*, 22(2): 111-104. Available from: <http://journal.unair.ac.id/filerPDF/MKH-22-2-20.pdf>. Diakses 5 Juni 2014.
24. Pebriana RB, Wardhani BWK, Widayanti E, Wijayanti NL, Wijayanti TR, Riyanto S, Meyanto E. 2008. Pengaruh Ekstrak Metanolik Daun Kenikir (*cosmos caudatus kunth*.) Terhadap Pemacuan Apoptosis Sel Kanker Payudara.Pharmacon, 9 (1): 26-21. Available from: <http://ccrc.farmasi.ugm.ac.id/wp-content/uploads/5.-Ratna-B.-KENIKIR.pdf>. Diakses5 Juni2014.