

RESEARCH ARTICLE

BIOVIABILITAS EKSTRAK DAUN MANGROVE (*Sonneratia alba*) TERHADAP KULTUR SEL FIBROBLAS *BHK-21*

*(Bioviability of Mangrove Leaves Extract (Sonneratia alba) on
Fibroblast BHK-21 Cell Culture)*

Arlita Gladys Tricia Charyadie*, Aprilia**, Widyastuti***

*Sarjana Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Hang Tuah Surabaya

** Departemen Konservasi Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Hang Tuah Surabaya

*** Departemen Periodonsia Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Hang Tuah Surabaya

ABSTRACT

Background: Dental caries is a major oral health problem which is most commonly found in Indonesia. One of the main factors in role of causing dental caries is *Streptococcus mutans* which is the primary target of the prevention of caries. Leaf extract of *Sonneratia alba* has been proven to have an antimicrobial effect towards *Streptococcus mutans*, but its cytotoxic activity on normal cells is still unknown. The initial cell viability in this study was conducted using cell line BHK-21. **Purpose:** The aim of this study is to determine the cell viability of fibroblast cells line BHK-21 by given *Sonneratia alba*'s leaf extract. **Materials and Methods:** The experiment was conducted using post test only control group design. BHK-21 fibroblast cell culture on 96 wells were divided into cell control group ($n=9$), media control group ($n=9$) and test groups ($n=9$). The test groups were given various concentration of *Sonneratia alba*'s leaf extract, they were: 5%; 10%; and 20%. The cell cultures were incubated for 24 hours before and after treatment using *Sonneratia alba*'s leaf extract. After dripping MTT into the microplates, OD were read using ELISA reader and the viability were counted. The data that was acquired from the viability calculation was statistically analyzed using One Way ANOVA and LSD test. **Results:** Data showed the increase of viability cell in all the test groups. The highest viability cell showed by the test group with 10% concentration of *Sonneratia alba* ($153,7122\% \pm 7,42458$), and the lowest found in the test group with 20% concentration of leaf extract ($141,4682\% \pm 7,48752$). **Conclusion:** In this experiment, the leaf extract of *Sonneratia alba* proved to be nontoxic on fibroblast cells line BHK-21, the extract increased the viability and also caused proliferation of fibroblast cells.

Keywords: Dental caries, *Sonneratia alba*, fibroblast, viability, cell culture

Correspondence: Aprilia, Department of Conservation, Faculty of Dentistry, Hang Tuah University, Arif Rahman Hakim 150, Surabaya, Phone 031-5945864, Email: drg.aprilia.spkg@gmail.com

ABSTRAK

Latar belakang: Karies merupakan penyakit gigi dan mulut yang paling banyak ditemukan di Indonesia. Salah satu faktor utama penyebab karies adalah bakteri *Streptococcus mutans* yang merupakan target utama dalam upaya pencegahan karies Ekstrak daun mangrove *Sonneratia alba* terbukti memiliki aktivitas antimikroba terhadap bakteri *Streptococcus mutans*, tetapi aktivitas sitotoksiknya terhadap sel normal masih belum diketahui. Pengujian sitotoksitas tingkat awal pada penelitian ini menggunakan metode kultur sel. **Tujuan:** Membuktikan bioviabilitas ekstrak daun mangrove *Sonneratia alba* terhadap sel fibroblas. **Bahan dan Metode:** Penelitian ini dilakukan menggunakan rancangan post test only control group design. Kultur sel fibroblas BHK-21 dalam 96 sumuran dibagi menjadi kelompok kontrol sel ($n=9$), kontrol media ($n=9$) dan perlakuan ($n=9$). Kelompok perlakuan terdiri dari berbagai konsentrasi ekstrak daun mangrove *Sonneratia alba*: 5%; 10%; dan 20%. Kultur sel diinkubasi selama 24 jam sebelum dan sesudah perlakuan. Setelah diberi MTT, OD dibaca dengan ELISA reader dan dihitung persentase viabilitasnya. Data viabilitas sel tersebut dianalisa dengan uji statistik One Way ANOVA dan LSD. **Hasil:** Data menunjukkan bahwa viabilitas sel meningkat pada semua kelompok perlakuan. Viabilitas tertinggi terjadi pada kelompok perlakuan dengan konsentrasi daun *Sonneratia alba* 10% ($153,7122\% \pm 7,42458$), sedangkan viabilitas terendah terjadi pada konsentrasi 20% ($141,4682\% \pm 7,48752$). **Simpulan:** Ekstrak daun mangrove *Sonneratia alba* terbukti tidak bersifat toksik dan justru meningkatkan proliferasi sel fibroblas.

Kata kunci: Karies, *Sonneratia alba*, fibroblas, viabilitas, kultur sel.

Korespondensi: Aprilia, Baian Konservasi, Fakultas Kedokteran Gigi, Universitas Hang Tuah, Arif Rahman Hakim 150, Surabaya, Telepon 031-5945864, Email: drg.aprilia.spkg@gmail.com

PENDAHULUAN

Karies merupakan penyakit gigi dan mulut yang paling banyak ditemukan di masyarakat baik dewasa maupun anak-anak.^{1,2} Menurut hasil Riset Kesehatan Dasar tahun 2013, terjadi peningkatan prevalensi karies di Indonesia dibandingkan tahun 2007 sebesar 9,8% menjadi 53,2%, yang berarti kurang lebih 93.998.727 penduduk Indonesia menderita karies. Berdasarkan prevalensi karies menurut provinsi, dapat dilihat 22 dari 33 provinsi di Indonesia menunjukkan prevalensi karies aktif lebih dari 50% penduduk setempat.³ Hal ini menunjukkan rendahnya kesadaran dan motivasi masyarakat dalam hal pentingnya perawatan karies. Karies bukan merupakan suatu penyakit yang

berpotensi mengancam nyawa, tetapi biaya yang diperlukan untuk perawatan karies tergolong sangat besar dibandingkan dengan perawatan-perawatan gigi lainnya. Pendapatan penduduk negara berkembang seperti Indonesia dianggap sangat berpengaruh terhadap tinggi rendahnya prevalensi karies.⁴ Indonesia memerlukan metode-metode baru yang lebih efektif dan efisien dalam hal perawatan gigi yang dapat digunakan oleh masyarakat secara luas.

Pencegahan karies yang adekuat dengan harga yang terjangkau adalah dengan mencegah akumulasi plak yang dapat dilakukan dengan pelaksanaan kontrol plak. Metode kontrol plak dapat dilakukan secara kimiawi yaitu dengan menggunakan obat kumur.⁵ Obat kumur yang mengandung

antibakteri dapat menurunkan jumlah koloni bakteri patogen dalam rongga mulut dan mengurangi terbentuknya plak dan karies gigi.⁶

Telah diketahui bahwa tanaman yang mengandung komponen bioaktif memiliki kemampuan untuk menghambat pertumbuhan bakteri.⁷ Komponen-komponen bioaktif tersebut merupakan suatu metabolit sekunder seperti alkaloid, steroid, tanin dan senyawa fenol yang disintesis dan disimpan dalam bagian yang spesifik atau semua bagian dari suatu tanaman.⁸ *Sonneratia alba* merupakan salah satu tanaman mangrove dari famili *Sonneratiaceae* yang kaya akan tanin yang dikenal akan aktivitas antimikrobanya.^{7,9} Ekstrak etanol dari *Sonneratia alba* terdapat kandungan saponin, tanin, fenol dan minyak esensial, sedangkan pada ekstrak airnya ditemukan tanin dan fenol.¹⁰ Senyawa-senyawa bioaktif seperti fenol, tanin dan saponin yang digunakan sebagai antibakteri memiliki sifat toksik yang diperlukan untuk menghambat pertumbuhan bakteri.

Hasil penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa ekstrak daun *Sonneratia alba* memiliki daya hambat yang cukup signifikan terhadap pertumbuhan bakteri gram positif dan gram negatif, seperti *S. aureus*, *B. cereus*, dan *E. coli*.⁷ Penelitian yang lain menunjukkan bahwa ekstrak daun *Sonneratia alba* memiliki daya antibakteri terhadap *Streptococcus mutans* yang merupakan salah satu faktor utama penyebab karies.¹¹ Hasil penelitian ini memperlihatkan potensi ekstrak daun *Sonneratia alba* sebagai alternatif obat antimikroba konservatif.

Bahan atau material di bidang kedokteran gigi yang diaplikasikan dalam rongga mulut harus bersifat

biokompatibel, yang artinya dapat diterima oleh tubuh, tidak iritan, tidak bersifat kariogenik, tidak menimbulkan reaksi alergi dan tidak toksik.¹² Salah satu uji biokompatibilitas secara *in vitro* yang dapat digunakan dan memenuhi standar sesuai pertimbangan faktor etis, praktis dan ekonomis yaitu uji viabilitas pada kultur sel.¹³ Berdasarkan uraian diatas, perlu dilakukan uji viabilitas lebih lanjut untuk mengetahui efek-efek negatif yang mungkin ada dalam daun *Sonneratia alba*. Kultur sel yang akan dipakai dalam penelitian ini adalah kultur sel fibroblas BHK-21 dengan konsentrasi ekstrak daun *Sonneratia alba* sebesar 5%, 10%, 20% yang mengacu dari penelitian sebelumnya.¹¹

BAHAN DAN METODE

Penelitian yang dilakukan merupakan jenis penelitian *true experimental* dengan rancangan penelitian *post test only control group design*.

Adapun parameter yang dilihat pada penelitian ini adalah jumlah sel fibroblas hidup pada kultur sel setelah diberi perlakuan. Kelompok perlakuan pada penelitian ini dibagi berdasarkan konsentrasi ekstrak daun *Sonneratia alba* yang akan digunakan, yaitu kelompok P₁ dengan konsentrasi ekstrak 5%, kelompok P₂ dengan konsentrasi ekstrak 10% dan kelompok P₃ dengan konsentrasi ekstrak 20%.

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah Bejana tertutup, kertas saring, botol Roux, vortex, mikroskop cahaya, mikroskop, *multichannel* pipet 25µl, corong *Buchner*, labu ukur, gelas ukur, erlenmeyer, tabung reaksi, *microwell plate*

96 lubang, inkubator CO₂, mikropipet, pipet tetes, pipet volume, sentrifugator, *shaker*, timbangan autoklaf, *laminar flow*, *ELISA reader*, *water bath*, *mechanical blender*, dan *hemocytometer*. Bahan yang digunakan adalah Akuades steril, ekstrak daun *Sonneratia alba*, etanol 96%, kultur sel fibroblas *BHK-21*, media *RPMI*, *trypsin* *versene*, *Fetal Bovine Serum* (FBS) 10%, *Phosphat Buffer Solution* (PBS), DMSO (*dimethyl sulfoxide*), MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl) 2,5-diphenyl tetrazolium bromide].

Prosedur penelitian ini dimulai dengan persiapan daun *Sonneratia alba* yang dipetik dari hutan mangrove di Wonorejo sebanyak 3 kg. Daun dibersihkan dengan akuades untuk menghilangkan kotoran yang menempel dan dikeringkan pada suhu ruangan 37°C tanpa sinar matahari langsung sampai kering.⁷ Berat daun sesudah pengeringan menjadi 1,5 kg dan dilakukan pemilihan daun kering yang berwarna hijau cerah sebagai tanda daun masih mengandung senyawa klorofil.¹⁴ Daun *Sonneratia alba* kering diblender dengan menggunakan *mechanical blender* dan diayak dengan saringan halus 1 mm. Pembuatan ekstrak dilakukan dengan menggunakan metode maserasi, simplisia kering direndam dalam pelarut etanol 96% selama 1 jam dan proses ini dilakukan selama 3 hari.¹⁵ Maserat dipisahkan dari residu dengan cara dekantasi, kemudian diuapkan dengan *rotary evaporator* dan disterilisasi menggunakan *filter syringe* steril dengan pori-pori 0,2 µm.^{7,16}

Sel fibroblas pada penelitian ini menggunakan stem sel fibroblas *BHK-21* yang berasal dari Pusat Veteriner Farma (Surabaya) yang dibiakkan

secara murni pada media *Rosewell Park Memorial Institute 1640* (RPMI-1640). Kultur sel induk (*seed cells*) yang sebelumnya telah dibekukan dicairkan terlebih dahulu dalam akuades steril dengan suhu 37°C. Kultur sel induk kemudian diputar dengan *centrifuge* 500 rpm selama 5 menit. Supernatan yang ada dibuang hingga menyisakan endapan sel di dasar. Endapan tersebut diambil dan disuspensikan dengan media *RPMI* dan *fetal bovine serum* 10%. Media *RPMI* sebanyak 36 ml dituang ke dalam botol yang berisi serum 4 ml sehingga didapatkan hasil akhir 40 ml media *RPMI* dan serum. Endapan sel yang telah disuspensikan ditanam di botol *roux* steril, lalu diinkubasikan 37°C, 5% CO₂ sampai sel *monolayer* terbentuk, kurang lebih selama 2 hari, lalu dilihat dengan mikroskop. Sel kemudian dipersiapkan untuk dipindahkan ke dalam *microplates*. Media dalam botol *roux* besar yang berisi sel *BHK-21* tersebut dibuang dan dicuci dengan PBS 15 ml sebanyak 3-5 kali. Botol *roux* tersebut diisi dengan *versene trypsin* sebanyak 1 ml. Sel-sel dalam botol akan terlihat menggerombol, lalu dihomogenisasikan dengan media *RPMI* sebanyak 10 ml. Sel yang telah homogen tersebut dimasukkan ke dalam *microplates 96 well* dengan kepadatan 2 x 10⁵ sel/ml. Kepadatan sel dihitung menggunakan *hemocytometer*. *Microplates* lalu diinkubasi selama 24 jam dalam inkubator dengan suhu 37°C dan aliran CO₂ 5%.¹

Sel fibroblas dalam *microplates* yang telah diinkubasi diberi perlakuan dengan ekstrak daun *Sonneratia alba* yang sudah disiapkan sebelumnya. Ekstrak dibuat seri dengan konsentrasi 5%, 10% dan 20% dengan 9 kali

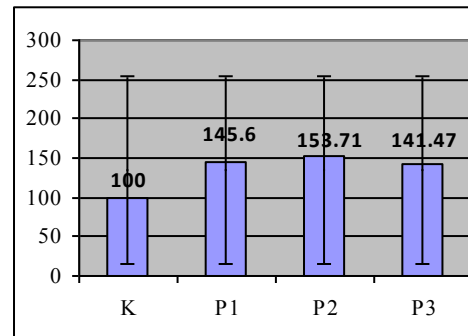
ulangan. Larutan ekstrak dimasukkan ke dalam *microplates* 96 well sebanyak 100 μ l. Pengujian menggunakan 3 jenis variabel, yaitu kontrol sel (terdiri dari 100 μ l sel dan 100 μ l media), sampel dalam berbagai konsentrasi (100 μ l ekstrak dan 100 μ l media) dan kontrol media (200 μ l media kultur). Sel kemudian diinkubasi selama 24 jam dalam inkubator 37°C, 5% CO₂.¹⁷

Sebelum dilakukan pembacaan dengan *ELISA Reader*, media dibuang lalu setiap well diberi *MTT* sebanyak 10 μ l dan diinkubasi selama 4 jam, setelah itu setiap well diberi 50 μ l DMSO dan digoyangkan dengan alat *shaker*. Pembacaan dilakukan dengan memasukkan *microplate* tersebut ke dalam *ELISA Reader* dengan panjang gelombang 620 nm dan mengukur absorbansinya. Besar absorbansi menunjukkan jumlah sel yang hidup dalam kultur media. Hasil bacaan kemudian dikonversikan ke dalam persentase dengan rumus yang sesuai.^{17,18}

$$\text{Viabilitas sel} = \frac{\text{OD perlakuan} + \text{OD kontrol media}}{\text{OD kontrol sel} + \text{OD kontrol media}} \times 100\%$$

HASIL

Data yang diperoleh dari hasil penelitian dianalisis secara deskriptif yang bertujuan untuk memperoleh gambaran distribusi dan peringkasan data guna memperjelas penyajian hasil. Perhitungan hasil uji viabilitas dengan menghitung jumlah sel fibroblas yang hidup menggunakan uji statistik ANOVA dengan taraf signifikansi 95% ($p = 0,05$) pada program SPSS versi 16.0.



Gambar 1. Grafik rerata persentase viabilitas sel fibroblas *BHK-21*.

Hasil perhitungan menunjukkan persentase sel fibroblas yang hidup pada semua kelompok perlakuan >50% dengan persentase viabilitas sel tertinggi pada kelompok P₂ (kelompok perlakuan dengan konsentrasi ekstrak daun *Sonneratia alba* 10%) sebesar 153,712% dan persentase viabilitas sel terendah pada kelompok P₃ (kelompok perlakuan dengan konsentrasi ekstrak daun *Sonneratia alba* 20%) sebesar 141,468%.

Uji hipotesis dapat dilakukan bila data telah memenuhi syarat yaitu data terdistribusi normal dan varians data homogen. Uji normalitas menggunakan uji statistik *Shapiro-Wilk* karena sampel yang digunakan ≤ 50 dengan nilai signifikansi 0,05.

Hasil uji *Shapiro-Wilk* menunjukkan nilai signifikansi pada kelompok P₁ (kelompok perlakuan dengan konsentrasi ekstrak daun *Sonneratia alba* 5%) $p = 0,416$, kelompok P₂ (kelompok perlakuan dengan konsentrasi ekstrak daun *Sonneratia alba* 10%) $p = 0,404$, dan kelompok P₃ (kelompok perlakuan dengan konsentrasi ekstrak daun *Sonneratia alba* 20%) $p = 0,400$. Semua nilai signifikansi dari kelompok perlakuan didapatkan lebih besar dari 0,05 yang berarti data berdistribusi normal dan dilanjutkan ke uji

homogenitas menggunakan uji *Levene's Test*.

Nilai signifikansi diperoleh $p=0,272$ ($p>0,05$), sehingga dapat disimpulkan bahwa data hasil penelitian homogen.

Data penelitian yang terdistribusi normal dan variansnya homogen kemudian dianalisis dengan menggunakan uji parametrik yaitu *one way ANOVA* untuk mengetahui adanya perbedaan jumlah viabilitas sel pada masing-masing kelompok perlakuan secara terpisah maupun bersama-sama.

Tabel 1. Hasil uji *one way ANOVA*

	Sig.
Viabilitas sel	.038

Hasil uji *one way ANOVA* menunjukkan nilai signifikansi sebesar 0,038 ($p < 0,05$). Hal ini menunjukkan adanya perbedaan yang bermakna antar kelompok perlakuan.

Berdasarkan hasil tersebut, maka analisis data dilanjutkan dengan uji *LSD* untuk mengetahui kelompok mana yang memiliki perbedaan yang signifikan dengan nilai signifikan hasil uji *LSD* lebih kecil dari tingkat kesalahan penelitian sebesar 0,05 (5%), sebaliknya bila nilai signifikan uji *LSD* lebih besar dari 0,05 (5%) maka antar dua perlakuan tersebut tidak terdapat perbedaan yang signifikan.

Tabel 2. Hasil Uji *LSD*

Kelompok	Ekstrak daun <i>Sonneratia alba</i>		
	P ₁ (5%)	P ₂ (10%)	P ₃ (20%)
P ₁ (5%)		.027*	.248
P ₂ (10%)			.001*
P ₃ (20%)			

Keterangan: (*) : Ada perbedaan bermakna.

Dari hasil uji *LSD* didapatkan kelompok perlakuan P₁ dibanding

kelompok perlakuan P₂ ($p<0,05$) ada perbedaan yang bermakna. Kelompok perlakuan P₁ dibanding kelompok perlakuan P₃ ($p>0,05$) tidak memiliki perbedaan yang bermakna. Kelompok perlakuan P₂ dibanding kelompok perlakuan P₃ ($p<0,05$) memiliki perbedaan yang bermakna.

PEMBAHASAN

Penelitian ini menggunakan kultur sel fibroblas yang diberi perlakuan dengan menggunakan ekstrak daun *Sonneratia alba* sebagai sampel penelitian. Sel fibroblas digunakan karena sel ini paling banyak ditemukan dan merupakan sel utama jaringan ikat yang terletak pada lamina propia rongga mulut. Sel fibroblas juga mudah dibiakkan sehingga sering digunakan sebagai subjek penelitian biologis.^{13,19,20} Uji viabilitas pada penelitian ini dilakukan untuk melihat kemampuan pertahanan sel fibroblas terhadap ekstrak daun *Sonneratia alba* secara *in vitro* karena penelitian *in vitro* memenuhi standar sesuai pertimbangan faktor etis, praktis dan ekonomis. Beberapa keuntungan dari penelitian *in vitro* diantaranya adalah sistem parameter penilaian lebih sederhana, mudah dikontrol, meminimalkan variabel pembaur dan penentuan mekanisme toksisitas lebih spesifik.^{12,13}

Ekstrak daun *Sonneratia alba* yang digunakan dilarutkan dengan etanol. Pelarut dalam proses ekstraksi akan melarutkan bahan yang polaritasnya sejenis.²¹ Etanol sebagai pelarut memiliki sifat polar sekaligus non polar. Etanol bersifat polar karena memiliki gugus hidroksil (-OH) dan bersifat non polar karena memiliki gugus hidrokarbon (CH₂CH₃).

Penelitian ini bertujuan mengetahui viabilitas sel fibroblas terhadap ekstrak daun *Sonneratia alba* sehingga pada proses ekstrak akan lebih baik bila semua komponen, baik polar maupun

Berdasarkan studi literatur, peningkatan viabilitas sel fibroblas disebabkan karena kandungan senyawa sitotoksik seperti flavonoid, saponin, tanin dan alkaloid dapat diimbangi dengan senyawa-senyawa yang memicu proliferasi sel. Senyawa yang diduga mampu meningkatkan proliferasi sel tersebut antara lain xylitol, sukrosa, dan nukleotida.

Xylitol pada ekstrak daun *Sonneratia alba* diduga berperan dalam memicu proliferasi sel fibroblas. Proliferasi dapat diinduksi oleh paparan suatu agen yang akan berinteraksi dengan sinyal-sinyal yang terdapat di dalam sel. Xylitol diduga dapat berperan sebagai agen yang dapat mengintervensi dan mengaktifasi jalur transduksi sinyal sel yang kemudian akan memicu sel untuk berproliferasi.²²

Senyawa sukrosa dalam ekstrak daun *Sonneratia alba* juga diduga dapat memicu proliferasi sel fibroblas. Suatu senyawa sukrosa yaitu SOS (*Sucrose Octasulfate*) diketahui dapat meniru kerja heparin dalam merangsang *Fibroblast Growth Factor* yang menyebabkan proliferasi.^{23,24}

Nukleotida merupakan elemen yang banyak diperlukan dalam proses biologis dan disintesis secara konstan di dalam sel. Nukleotida dalam proses metabolisme sel berperan sebagai koenzim, pengatur, substrat aktivasi, senyawa dalam fase anabolik dan pembentukan subunit dari asam nukleat. Proliferasi sel, dalam pembelahan normal selama embriogenesis maupun proliferasi yang terkontrol dalam sistem

non polar dapat ikut terpisah. Meskipun sifat polar pelarut etanol lebih dominan, tetapi diharapkan sebagian komponen polar juga dapat terpisah.

hematopoietik, membutuhkan suplai yang cukup dari nukleotida.²⁵

Penurunan viabilitas sel yang terjadi pada kelompok perlakuan dengan konsentrasi ekstrak daun *Sonneratia alba* 20% dapat disebabkan karena pembentukan formazan ungu oleh garam tetrazolium mengacu pada sel yang aktif secara metabolik. Aktivitas metabolik tiap sel berbeda, terkadang dijumpai sel yang hidup dan menunjukkan aktivitas metabolik tetapi hanya sedikit atau bahkan tidak berproliferasi.²⁶ Ketidaksesuaian hasil pembacaan juga dapat disebabkan oleh komposisi ekstrak daun *Sonneratia alba* yang dapat mengendap. Pengendapan pada *well* yang telah terpapar ekstrak akan mengganggu proses pembacaan dengan *ELISA reader*.

SIMPULAN

Menurut hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa ekstrak daun *Sonneratia alba* meningkatkan viabilitas sel dan bersifat proliferaatif terhadap kultur sel fibroblas *cell line BHK-21*.

DAFTAR PUSTAKA

1. Radiah, Mintjelungan C, Mariati NW. Gambaran Status Karies dan Pola Pemeliharaan Kesehatan Gigi dan Mulut pada Mahasiswa Asal Ternate di Manado. *Jurnal e-GiGi (EG)*. 2013; 1(1): 51-45.
2. Wala HC, Wicaksono DA, Tambunan E. Gambaran Status Karies Gigi Anak Usia 11-12 Tahun pada Keluarga Pemegang Jamkesmas di Kelurahan Tumatangtang I Kecamatan Tomohon Selatan [skripsi].

- Manado: Fakultas Kedokteran Universitas Sam Ratulangi; 2013.
3. Balitbang Kemenkes RI. Riskesdas 2013 dalam Angka. Jakarta: Balitbang Kemenkes RI; 2013. p. 189.
 4. Pepperney A dan Chikindas ML. Antibacterial Peptides: Opportunities for the Prevention and Treatment of Dental Caries. *Probiotics & Antimicrobial Protein*. 2011; 3:96-68.
 5. Newman MG, Takei HH, Klokkevold PR, Carranza FA. Carranza's Clinical Periodontology. 12th ed. Missouri: Saunders Elsevier; 2015. p. 947-8
 6. Sumono A dan Wulan A. Kemampuan Air Rebusan Daun Salam (*Eugenia polyantha W*) Dalam Menurunkan Jumlah Koloni Bakteri *Streptococcus sp*. *Majalah Farmasi Indonesia*. 2009; 20(3): 112-7.
 7. Saad, S, Taher M, Susanti D, Qrallah H, Izyani, AF. In vitro Antimicrobial Activity of Mangrove Plant *Sonneratia alba*. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 2012. p. 427-9.
 8. Patra JK and Mohanta YK. Antimicrobial Compounds From Mangrove Plants: A Pharmaceutical Prospective. *Chinese Journal of Integrative Medicine*. 2014; 20: 320-311.
 9. Milon MA, Muhit MA, Goshwami D, Masud MM and Begum B. Antioxidant, Cytotoxic and Antimicrobial Activity of *Sonneratia alba* Bark. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*. 2012; 3(7): 2237-2233.
 10. Sahoo G, Mulla N, Ansari ZA, Mohandass C. Antibacterial Activity of Mangrove Leaf Extracts Against Human Pathogens. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2012; 74(4): 351-348.
 11. Mursyidah B. Daya Hambat Ekstrak Daun Mangrove (*Sonneratia alba*) terhadap Pertumbuhan Bakteri *Streptococcus mutans* [skripsi]. Surabaya: Universitas Hang Tuah; 2014.
 12. Yuliati A. Viabilitas Sel Fibroblast BHK-21 Pada Permukaan Resin Akrilik Rapid Heat Cured. *Majalah Kedokteran Gigi Dental Journal*. 2005; 38(2): 72-68.
 13. Dewi TP. Efek Sitotoksik *Tetrahydrozoline* HCL terhadap Viabilitas Sel Fibroblas. *Interdental Jurnal Kedokteran Gigi*. 2007; 5(1): 7-1.
 14. Herawati N, Jalaluddin N, Dahi L, Zenta F. *Sonneratia alba* sebagai Sumber Senyawa Antibakteri Potensial. *Indonesia Chemica Acta*. 2009; 2(2): 10-6.
 15. Wijayanti ED. Pengaruh Pemberian Ekstrak Daun Api-Api (*Avicennia marina*) Terhadap Resorpsi Embrio, Berat Badan dan Panjang Badan Janin Mencit (*Mus musculus*) [skripsi]. Surabaya: Universitas Airlangga; 2011.
 16. Herawati N. Potensi Antioksidan Ekstrak Kloroform Kulit Batang Tumbuhan Mangrove (*Sonneratia alba*). *Jurnal Chemica*. 2011; 12(1): 13-9.
 17. Sholikhah M. Uji Sitotoksitas Ekstrak Daun Mengkudu (*Morinda citrifolia* L.) Terhadap Sel Fibroblas dengan Esai MTT [skripsi]. Surabaya: Universitas Airlangga; 2010.
 18. Ayuningtyas N. Uji Sitotoksitas Ekstrak *Holothuria atra* (Teripang Keling) Terhadap Kultur Sel Fibroblas [skripsi]. Surabaya: Universitas Hang Tuah; 2012.
 19. Rovani CA, Kamizar, Usman M. Perbandingan Sitotoksitas Endomethasone, AH Plus dan Apexit Plus Terhadap Sel Fibroblas dengan Teknik Root Dipping. *Dentofasial*. 2008; 7(2): 70-8.
 20. Junqueira LC dan Carneiro J. Histologi Dasar Teks & Atlas. Edisi ke-10. Jakarta: EGC; 2007.
 21. Tiwari P, Kumar B, Kaur M, Kaur G, Kaur H. Phytochemical screening and Extraction: A Review. *Internationale Pharmaceutica Scientia*. 2011; 1(Jan-Mar 2011): 106-98.
 22. Rahadian B. Efek Xylitol Terhadap Viabilitas dan Profil Protein Sel-sel Pulpa Gigi (*in vitro*) [skripsi]. Jakarta: Universitas Indonesia; 2008.
 23. Fannon M, Williams KF, Nugent MA, Gregory KJ, Chu CL, Wildt AL, Panigrahy D, Kaipainen A, Barnes C, Lapp C, Shing Y. Sucrose Octasulfate Regulates Fibroblast Growth Factor-2 Binding, Transport, and Activity: Potential for Regulation of Tumor Growth. *Journal of Cellular Physiology*. 2008; 215(2): 441-434.
 24. Yeh BK, Eliseenkova AV, Plotnikov AN, Green D, Pinnell J, Polat T, Linde AG, Linhardt RJ, Mohammadi M. Structural Basis for Activation of Fibroblast Growth Factor Signaling by Sucrose Octasulfate. *Molecular and Cellular Biology*. 2012; Oct; 22(20): 7192-7184.
 25. Lane AN dan Fan TW. Regulation of mammalian nucleotide metabolism and biosynthesis. *Nucleic Acids Research*. 2015; 43(4): 2466-85.
 26. Buch K, Peters T, Nawroth T, Sanger M, Schmidberger H, Langguth P. Determination of Cell Survival After Irradiation Via Clonogenic Assay Versus Multiple MTT Assay-A comparative study. *Radiation Oncology*. 2012; 7:1.