

ARTIKEL PENELITIAN

Pengaruh variasi konsentrasi ekstrak kulit batang jambu mete terhadap sitotoksikitas sel fibroblas

H. Harsini* dan Ahmed Febri Noor Hertama**

*Departemen Ilmu Biomaterial, Fakultas Kedokteran Gigi, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta, Indonesia

**Program Studi Ilmu Kedokteran Gigi, Fakultas Kedokteran Gigi, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta, Indonesia
JI Denta No 1, Sekip Utara, Yogyakarta, Indonesia; e-mail: harsiniugm@yahoo.com

ABSTRAK

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui kandungan ekstrak kulit batang jambu mete dan pengaruh variasi konsentrasi terhadap sitotoksikitas sel fibroblas. Penelitian ini menggunakan bahan kulit batang jambu mete (Mojolegi) yang diidentifikasi dan diekstrak menggunakan metode maserasi dengan pelarut etanol 70%. Ekstrak diuji kandungannya menggunakan metode KLT (Kromatografi Lapis Tipis). Uji sitotoksikitas menggunakan sampel sejumlah 15 dikelompokkan menjadi 5, masing-masing kelompok 3 (ISO-10993-5). Variasi konsentrasi adalah 1,6%, 0,8%, 0,4%, 0,2% dan 0,05%. Uji sitotoksikitas menggunakan metode MTT dengan cara membandingkan *optical density* (ELISA *plate reader*) antar kelompok perlakuan dengan kelompok kontrol. Viabilitas sel didapatkan dengan membandingkan nilai *optical density* pada kelompok perlakuan dan kelompok kontrol. Data viabilitas sel dianalisis menggunakan ANAVA satu jalur dan LSD. Hasil penelitian menunjukkan rerata ekstrak mengandung senyawa asam anakardat dan asam galat. Uji sitotoksikitas sel fibroblas akibat variasi ekstrak kulit batang jambu mete secara berturut-turut dari konsentrasi 1,6%, 0,8%, 0,4%, 0,2% dan 0,05% dengan rerata sebesar $15,35\% \pm 0,443$, $30,84\% \pm 1,59$, $47,78\% \pm 8,09$, $65,74\% \pm 3,20$, $74,95\% \pm 7,26$. Uji ANAVA menunjukkan adanya pengaruh variasi konsentrasi ekstrak kulit batang jambu mete bermakna terhadap viabilitas sel ($p < 0,05$). Hasil uji LSD menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang bermakna ($p < 0,05$) antar kelompok perlakuan, kecuali antara konsentrasi 0,05% dengan konsentrasi 0,2%. Kesimpulan Ekstrak kulit batang jambu mete mengandung asam anakardat dan asam galat dan terdapat pengaruh variasi konsentrasi ekstrak kulit batang jambu mete terhadap sitotoksikitas sel fibroblas. Konsentrasi 0,2% merupakan konsentrasi yang tidak toksis terhadap sel fibroblas secara in vitro

Kata kunci: bahan kumur, ekstrak kulit batang jambu mete, MTT assay, sel fibroblas

ABSTRACT: *The influence of cashew stem bark extract on cytotoxicity fibroblast. The aim of this study was to determine the effect of variation in the concentration of cashew stem bark extract as the base material of mouthwash of the cytotoxic effect on fibroblast cells. The material used in this study was cashew stem bark extracted by maceration method using 70% of ethanol. A total of 15 samples were grouped into 5, each of which consisted of 3 samples (ISO 10993-5). Concentrations used were 1.6%, 0.8%, 0.4%, 0.2% and 0.05%. Cytotoxicity test used the MTT method by comparing the optical density (ELISA plate reader) between treated groups with control groups. Cell viability was obtained by comparing the treated groups with control groups. Cell viability data was analyzed using one-way ANOVA and LSD. The results showed that cashew stem bark has an anticardiac acid. Cytotoxicity test used the mean of fibroblast cell viability due to various cashew stem bark extracts successively from concentrations 1.6%, 0.8%, 0.4%, 0.2% and 0.05% with the mean of $15.35 \pm 0.443\%$, $30.84\% \pm 1.59$, $47.78 \pm 8.09\%$, $65.74\% \pm 3.20$, $74.95 \pm 7.26\%$. ANOVA showed a significant influence of various cashew stem bark on cell viability ($p < 0,05$). The results of LSD showed a significant difference between treated groups except between concentrations 0.95% and 0.2%. In conclusion, Cashew extract have anacardic acid and there was influence on various cashew stem bark extract concentrations on the cytotoxicity of fibroblast cell. The concentration of 2% was not cytotoxic.*

Keywords: mouthwash, cashew stem bark extract, MTT assay, cell fibroblast

PENDAHULUAN

Stomatitis aftosa rekuren dikenal juga sebagai sariawan, *recurrent aphthae*, atau *recurrent oral ulceration*. Stomatitis aftosa rekuren merupakan radang yang terjadi di daerah mukosa mulut, biasanya berupa bercak putih kekuningan dapat tunggal maupun kelompok dengan permukaan yang agak cekung. Salah satu penanganan stomatitis aftosa dapat menggunakan bahan kumur.¹ Tujuan

pemakaian bahan kumur adalah mengantarkan bahan aktif untuk membersihkan permukaan gigi atau jaringan yang akan menghasilkan efek perawatan yang terbaik.² Bahan penyusun yang terdapat di dalam larutan kumur diantaranya adalah air, alkohol, zat pemberi rasa dan bahan pewarna. Kandungan lainnya berupa humektan, astringen, zat pengemulsi dan bahan-bahan terapeutik.³ Bahan kumur yang mengandung alkohol dapat menyebabkan

efek multipel yang tidak menguntungkan bagi penggunaannya, termasuk diantaranya adalah sensasi terbakar akibat kontak dengan mukosa mulut.⁴ Akhir-akhir ini dikembangkan bahan herbal yang mempunyai efek samping yang minimal.⁵

Jambu mete mempunyai nama latin *Anacardium occidentale* Linn merupakan salah satu tanaman yang banyak manfaatnya mulai dari akar, batang, daun dan serta buahnya.^{6,7} Kulit batang pohon jambu mete dapat digunakan sebagai bahan kumur untuk mengobati sariawan.⁸ Kulit batang jambu mete mengandung senyawa fenolik.⁹ Penyusun getah kulit batang jambu mete terdiri dari asam anakardat dan kardol.¹⁰ Senyawa fenolik dengan rantai samping yang relatif panjang mempunyai sifat iritan pada kulit.¹¹ Senyawa fenolik dapat mendenaturasi protein dari membran sel sehingga menyebabkan perubahan permeabilitas. Perubahan permeabilitas menyebabkan air masuk ke dalam sel yang akan mengakibatkan hidrolisis sel dan sel mati.¹² Profil sitotoksikitas dari tanaman selalu menjadi pertimbangan dalam pemakaian tanaman sebagai obat, terutama dalam penentuan dosis.¹³

Pada penelitian Tedong¹⁴ tentang akut dan subkronis toksikitas ekstrak daun jambu mete pada mencit, menunjukkan bahwa ekstrak daun jambu mete memiliki potensi toksikitas. Salah satu syarat bahan kumur adalah tidak toksik terhadap sel manusia. Untuk mengukur sitotoksikitas suatu bahan salah satu menggunakan uji in vitro.¹⁵ Sel fibroblas adalah sel yang paling banyak digunakan untuk uji sitotoksikitas material di bidang kedokteran gigi.¹⁶ Uji MTT digunakan untuk menguji aktivitas enzimatik pada sebuah sel. Prinsip dari Uji MTT yaitu terjadinya mekanisme perubahan warna kuning dari garam tetrazolium yang tereduksi menjadi kristal formazan dalam mitokondria sel hidup.¹⁷ Tujuan penelitian ini adalah mengetahui kandungan ekstrak kulit batang jambu mete sebagai dasar bahan kumur dan pengaruh variasi konsentrasi terhadap sitotoksikitas sel fibroblas.

METODE PENELITIAN

Pembuatan ekstrak kulit batang jambu mete

Pada penelitian ini digunakan kulit batang jambu mete yang diambil dari pohon jambu mete yang berada di daerah Mojolegi, Karang Tengah, Imogiri, Yogyakarta. Pembuatan ekstrak menggunakan cara

maserasi dengan pelarut alkohol 70%. Satu kilogram kulit batang jambu mete dibersihkan kulit luarnya dan dicuci bersih di bawah air mengalir, setelah itu diiris kecil-kecil dan dikeringkan menggunakan oven dengan suhu 40-50 °C selama kurang lebih 1 x 24 jam. Setelah kering, kulit batang jambu mete dibuat menjadi serbuk dengan menggunakan blender kecil dan ditimbang. Serbuk seberat 300 g dilarutkan dalam etanol 70% sebanyak 1 liter dan didiamkan selama 24 jam. Selanjutnya dipisahkan dengan cara disaring menggunakan corong *buchner* yang dilapisi kertas saring sehingga diperoleh filtrat dan ampas. Filtrat yang diperoleh diuapkan dengan menggunakan *waterbath* sehingga diperoleh ekstrak kental (Depkes, 2000). Selanjutnya ekstrak kental tersebut dideteksi menggunakan kromatografi lapis tipis untuk melihat kandungannya.

Analisis asam anakardat dan asam galat pada ekstrak

Analisis senyawa yang terkandung dalam kulit batang *jambu mete* dilakukan dengan menggunakan senyawa fenolik yaitu asam galat dan asam anakardat sebagai parameter spesifik senyawa yang terkandung di dalam ekstrak kulit batang *jambu mete* menggunakan Kromatografi Lapis Tipis (KLT). Pada metode KLT, fase diam yang digunakan yaitu silika gel 60 F₂₅₄, sedangkan fase gerak yang digunakan yaitu n-propanol : asam asetat : air (3 : 1 : 1 v/v/v).

Pada KLT, seberat 100 mg ekstrak dilarutkan dalam 1 mL metanol. Perbandingan yang digunakan adalah asam galat dan asam anakardat 10 mg/mL dalam pelarut etanol. Penotolan sampel ekstrak kulit batang jambu mete sebesar 1 µL kemudian dimasukkan dalam fase gerak sampai terdeteksi zat yang ada dalam silika. Kemudian dideteksi pada semprotan Iodium dan vanilin Sulfat pada sinar tampak, UV₂₅₄ dan UV₃₆₆.

Uji Sitotoksikitas menggunakan metode MTT

a. Pembuatan kultur sel

Sel yang digunakan adalah sel vero fibroblas yang berasal dari ginjal kera hijau Afrika (*Cercopithecus aethiops*). Pada tahap pemeliharaan kultur sel vero, media kultur dari sel vero monolayer di M199 K yang konfluen dibuang kemudian sel dibilas dengan 10 mL M199. Ditambahkan *trypsin*-EDTA sebanyak

5 mL dan inkubasi sel dilakukan pada suhu 37 °C selama 2 – 3 menit sampai terlihat tanda sel mulai terlepas dari *flask* sel akan berbentuk bulat-bulat. Selanjutnya, 5 mL media kultur M199 disuplementasi dengan 10% *fetal bovine serum* (FBS) ditambahkan agar *trypsin*-EDTA menjadi tidak aktif. Sel dibilas di dalam media dan pipet digunakan secara perlahan untuk menguraikan gumpalan sel. Suspensi sel dipindahkan dari *flask* ke dalam tabung kerucut (*conical tube*) 15 mL steril kemudian disentrifugasi selama 5 menit pada suhu ruangan. Supernatan dibuang dan sel disuspensi kembali menggunakan 10 mL M199 dengan 10% FBS. Pengenceran sel yang diinginkan dipersiapkan dari total 12 – 20 mL M199 dengan 10% FBS dan ditambahkan ke dalam *flask* kultur sel.

b. Pemberian ekstrak kulit batang jambu mete pada *Vero cell line* dengan metode MTT menurut ISO 10993-5 (2009)

Setiap sumuran pada 96 sumuran *microtiter tissue plate* diisi sel fibroblas dengan kepadatan 2×10^4 sel / 100 μ L. Kultur sel diinkubasi selama 24 jam. Sumuran diberi ekstrak kulit batang jambu mete dan diinkubasi selama 24 jam. Setelah kultur sel diinkubasi selama 24 jam, setiap sumuran diberi 100 μ L MTT, diinkubasi selama 4 jam pada suhu 37 °C, lalu diberi 100 μ L *Sodium Dodecyl Sulfate-Hydrochloric Acid* (SDS-HCL), selanjutnya microplate dimasukkan pada ELISA *plate reader* dengan panjang gelombang 550 nm. Pada uji MTT, nilai *optical density* (OD) diperoleh dari penghitungan terhadap jumlah kristal formazan yang terbentuk. Sitotoksikitas diukur berdasarkan viabilitas sel relatif terhadap kontrol dengan rumus sebagai berikut:

$$\% \text{ sel viabel} = \frac{\text{Optical Density Perlakuan}}{\text{Optical Density Kontrol}} \times 100$$

HASIL PENELITIAN

Kandungan ekstrak kulit batang jambu mete yang dideteksi menggunakan kromatografi lapis tipis, memperlihatkan bahwa sampel kemungkinan mengandung senyawa asam galat dan asam anakardat karena sampel memiliki hR_f yang menyerupai hR_f asam galat dan asam anakardat sehingga dapat disimpulkan bahwa ekstrak kulit batang jambu mete secara maserasi mengandung senyawa asam galat (Gambar 1).

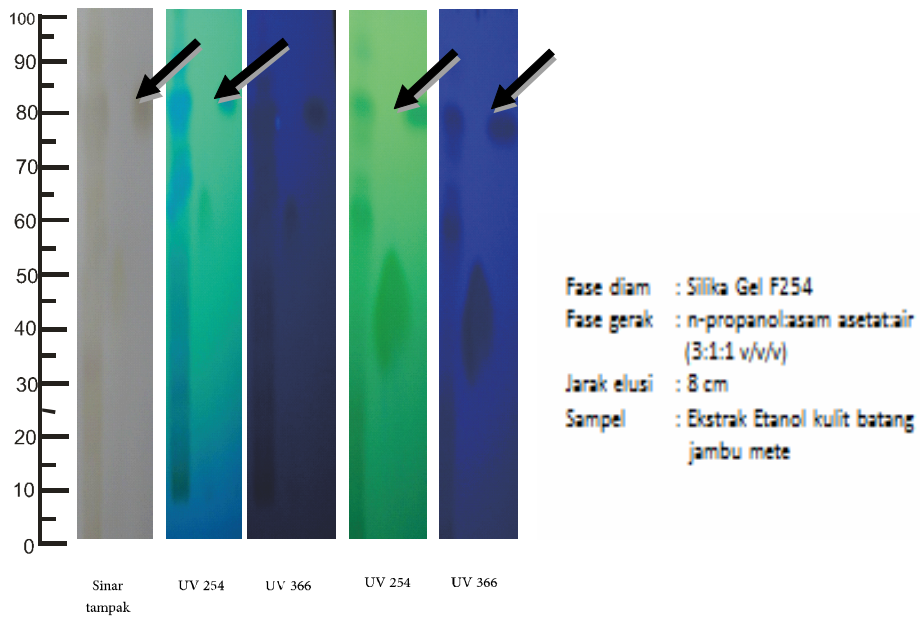
Penilaian sitotoksikitas Hasil nilai rerata persentase dan simpangan baku viabilitas sel fibroblas setelah penambahan ekstrak kulit batang jambu mete selama 24 jam tertera pada Gambar 2.

Hasil ANAVA pada Tabel 1 menunjukkan nilai $F_{hitung} > F_{tabel}$ bahwa variasi konsentrasi penambahan ekstrak kulit batang jambu mete terhadap viabilitas sel fibroblas menunjukkan pengaruh bermakna. Untuk mengetahui perbedaan rerata viabilitas antar kelompok sel fibroblas, dilakukan uji LSD yang rangkuman hasilnya disajikan pada Tabel 2.

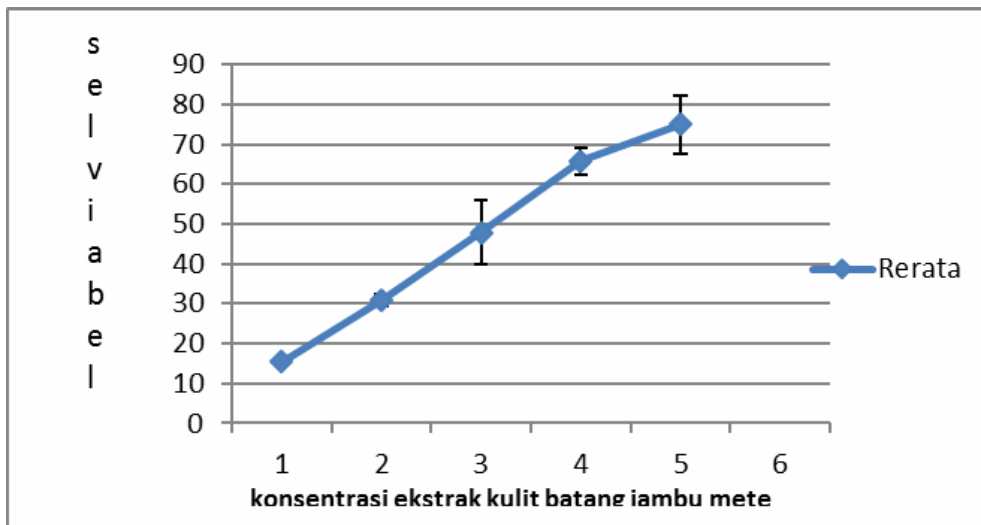
Berdasarkan hasil uji LSD pada Tabel 2 menunjukkan perbedaan rerata antar kelompok bermakna kecuali antara konsentrasi 0,2% dengan 0,05% yang menunjukkan adanya perbedaan tetapi tidak signifikan. Berdasarkan hasil ANAVA Tabel 1 dapat disimpulkan bahwa hipotesis yang menyatakan terdapat pengaruh variasi konsentrasi ekstrak kulit batang jambu mete terhadap sitotoksikitas sel fibroblas diterima.

PEMBAHASAN

Hasil penelitian tentang pengaruh konsentrasi ekstrak kulit batang jambu mete terhadap sel fibroblas pada Grafik 1 menunjukkan kecenderungan peningkatan rerata persentase kematian sel fibroblas terhadap penambahan konsentrasi ekstrak kulit batang jambu mete. Kematian sel disebabkan oleh toksisitas suatu material yang dipengaruhi oleh kandungan zat aktif dalam material tersebut.¹⁸ Hal ini menunjukkan bahwa ekstrak kulit batang jambu mete mempunyai kandungan yang dapat meningkatkan persentase kematian sel fibroblas. Hasil ini sesuai dengan penelitian Toxnet¹⁹ menyatakan bahwa toksisitas suatu material yang mengandung fenol salah satunya dipengaruhi oleh konsentrasi fenol dalam material tersebut. Pada penelitian ini, pengaruh yang ditimbulkan ekstrak kulit batang jambu mete adalah kematian sel fibroblas karena adanya gangguan aktivitas enzimatis sel terutama enzim mitokondria dehydrogenase. Hal ini diperkuat oleh teori Cotran dkk.,²⁰ yang menjelaskan bahwa rangsangan bahan toksik dapat menyebabkan jejas pada sel dengan cara merusak membran sel, mitokondria dan mengganggu substrat endogen sel.



Gambar 1. Kromatogram ekstrak kulit batang jambu mete setelah disemprot menggunakan Vanilin Sulfat dan Uap Iodium pada sinar tampak, UV₂₅₄ dan UV₃₆₆.



Gambar 2. Grafik rerata viabilitas sel fibroblas

Tabel 1. Rangkuman hasil ANAVA satu jalur pengaruh konsentrasi ekstrak kulit batang jambu mete terhadap viabilitas sel fibroblast

	Jumlah kuadrat	df	Rerata kuadrat	F	Sig.
Antar perlakuan	0,933	4	0,233	144,079	0,000
Dalam perlakuan	0,016	10	0,002		
Total	0,950	14			

Tabel 2. Rangkuman hasil uji *post hoc* LSD persentase viabilitas sel fibroblast setelah penambahan ekstrak kulit batang jambu mete

Konsentrasi ekstrak kulit batang jambu mete	Konsentrasi ekstrak kulit batang jambu mete				
	1,6%	0,8%	0,4%	0,2%	0,05%
1,6%	-				
0,8%	0,30*	-			
0,4%	0,49*	0,19*	-		
0,2%	0,63*	0,33*	0,14*	-	
0,05%	0,69*	0,38*	0,20*	0,055	

Keterangan: *terdapat perbedaan yang bermakna ($p < 0,05$)

Hasil uji ANAVA satu jalur pada Tabel 1 menunjukkan bahwa variasi konsentrasi ekstrak kulit batang jambu mete mempunyai pengaruh terhadap toksikitas sel fibroblas ($p < 0,05$). Hal ini sesuai dengan hipotesis yang menyatakan bahwa terdapat pengaruh variasi konsentrasi ekstrak kulit batang jambu mete sebagai bahan kumur terhadap sitotoksikitas sel fibroblas. Kulit batang jambu mete mengandung senyawa antara lain flavonoid, tanin, saponin dan penyusun getah kulit batang jambu mete terdiri dari asam anakardat dan kardol.¹⁰ Tanin dan flavanoid dalam ekstrak kulit batang jambu mete merupakan golongan fenol.²¹ Senyawa fenol dan turunannya bekerja dengan cara mendenaturasi protein sel di membran sel. Denaturasi protein di membran sel menyebabkan perubahan permeabilitas sel. Hal ini mengakibatkan membran sel tidak dapat mempertahankan komponen-komponen di dalam sel dan mengacaukan aliran bahan yang keluar masuk sel sehingga mengakibatkan sel mati. Menurut Juliantina,²² toksikitas tanin dapat merusak membran sel dengan cara mengkerutkan dinding sel atau membran sel sehingga mengganggu permeabilitas dinding sel. Terganggunya permeabilitas sel, sel tidak dapat melakukan aktivitas hidup sehingga sel mati.

Sitotoksisitas suatu bahan mengindikasikan kemungkinan adanya efek toksik yang akan ditimbulkan apabila material tersebut diaplikasikan secara klinis.²³ Menurut Meric dkk.²⁴ sitotoksikitas suatu material dapat diklasifikasikan berdasarkan persentase jumlah sel yang viabel yaitu: a. Tidak sitotoksik: $>90\%$ sel viabel. b. Sitotoksik ringan: $60 - 90\%$ sel viabel. c. Sitotoksik sedang: $30 - 59\%$ sel viabel dan d. Sitotoksik berat: $<30\%$ sel viabel

Hasil penelitian ini memperlihatkan viabilitas sel fibroblas dilihat dari hasil grafik I yang dibandingkan dengan Meric memperlihatkan bahwa konsentrasi 1,6% dengan nilai viabel 15,35% termasuk sitotoksik berat, konsentrasi 0,8% – 0,4% dengan nilai viabel 30,84% dan 47,78% termasuk sitotoksik sedang dan konsentrasi 0,2% – 0,05% dengan nilai viabel 65,74% dan 74,95% termasuk sitotoksik ringan.

Hasil uji LSD menunjukkan terdapat perbedaan yang bermakna ($p < 0,05$) antar semua kelompok perlakuan penambahan konsentrasi ekstrak kulit batang jambu mete terhadap viabilitas sel fibroblas kecuali kelompok konsentrasi 0,2% dan konsentrasi 0,05% menunjukkan hasil yang tidak signifikan. Menurut Cotran dkk.,²⁰ bahwa jejas yang terjadi pada sel sangat dipengaruhi oleh berat ringannya stimulus yang diperoleh sel. Konsentrasi bahan kimia diketahui berperan dalam menentukan berat-ringannya stimulus yang akan mengakibatkan jejas hingga kematian sel. Pada penelitian ini respon jejas sel fibroblas terhadap zat aktif ekstrak kulit jambu mete dengan konsentrasi 0,2% dan 0,05% didapatkan hasil yang tidak signifikan. Kematian sel diantaranya dapat disebabkan oleh paparan bahan yang bersifat toksik. Menurut Cotran²⁰ jejas sel dapat menimbulkan adaptasi dan kematian sel. Ketika sel sudah tidak mampu beradaptasi terhadap rangsang, maka sel akan mengalami kerusakan dan kematian. Menurut ISO 10993-5 bahwa suatu zat bisa diterima secara klinis apabila viabilitas sel $>70\%$. Berdasarkan pada penelitian ini disimpulkan bahwa konsentrasi 0,2% dan 0,05% ekstrak kulit batang jambu mete aman diaplikasikan secara klinis.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa: Ekstrak kulit batang jambu mete mengandung asam anakardat dan asam galat. Konsentrasi 0,2% merupakan konsentrasi yang tidak toksik terhadap sel fibroblas secara in vitro.

DAFTAR PUSTAKA

1. Cawson RA, Odell EW. Cawson's essentials of oral pathology and oral medicine, 7th ed. Churchill-Livingstone: Edinburgh; 2008. 220 – 224.
2. Powers JM, Sakaguchi RL. Craig's restoratedental materials, Mosby: USA; 2006. 514 – 516, 524 – 527.
3. Harris NO, Christen AG. Primary preventive dentistry, Second Edition, Upper Saddle River, New Jersey; 1997. 157 – 191.
4. Haq MW, Batool M, Ahsan SM, Qureshi NR. Alcohol use in mouthwash and possible oral health concerns. J Pak Med Assoc. 2009; 59(3):186 – 190.
5. Salma. Tujuh keunggulan obat herbal, Majalah Kesehatan. Sumer informasi kesehatan anda; 2010.
6. Kementrian Riset dan Teknologi. Teknologi Tepat Guna (TTG) budidaya pertanian jambu mete. 2005; diakses dari: www.iptek.net.id/ind/warintek/budidaya_pertanian.php.html, (30/09/12).
7. Akinpelu DA. Antimicrobial activity of Anacardium occidentale bark. Fitoterapia. 2001; 72: 826 – 827.
8. Prihatman K. Jambu mete, tentang budidaya pertanian, sistem informasi manajemen pembangunan di pedesaan, BAPPENAS, 2000, diakses dari: www.warintek.ristek.go.id/pertanian/jambu_mete, (12/2/2014).
9. Harsini, Sutardja I, Martono S, Sunarintyas S, Sudarsono. Potensi ekstrak jambu mete (Anacardium occidentale Linn.) sebagai bahan obat kumur. Disertasi program studi ilmu kedokteran kedokteran gigi. FKG, UGM; 2014.
10. Tampubolon O. Tumbuhan obat bagi pencinta alam. Jakarta: Penerbit bhatarra; 1995. 101 – 102.
11. Hegnauer R. Chemotaxonomie der Pflanzen. Stuttgart: Birkhäuser Verlag; 1986. 259 – 260.
12. Pelzar JM, Chan ECS. Dasar-dasar mikrobiologi 2. Jakarta: Penerbit UI Press; 1998. 457 – 460.
13. Pak E, Esrason KT, Wu VH. Hepato-toxicity of herbal remedie: An emerging dilemma. Prog Transplant. 2004; 14 – 91 – 6.
14. Tédong L, Dzeufiet DDP, Kamtchouing P. Acute and subchronic toxicity of anacardium occidentale linn (anacardiaceae) leaves hexane extract in mice. African Journal of Traditional, Complementary, and Alternative Medicines, Cameroon. 2007; 4(2): 140 – 147.
15. Sakaguchi RL, Powers JM. Craig's restorative dental materials, 13th ed. Philadelphia: Mosby Elsevier Inc; 2012. 327 – 348.
16. Schmalz G. Use of cell cultures for toxicity testing of dental materials: advantages and limitations. J Dent. 1994; 22: 6 – 11.
17. Amalia. Uji sitotoksik ekstrak etanol 70% buah merica (Piper nigrum L.) terhadap sel hela. Skripsi. Surakarta: Universitas Muhammadiyah Surakarta; 2008. 16.
18. Donatus IA. Toksikologi Dasar, Laboratorium Farmakologi dan Toksikologi Fakultas Farmasi Gadjah Mada, Yogyakarta; 2001. 7.
19. Toxnet. Phenol, National library of medicine, Rockville Pike, United state. 2013; diakses dari: <http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin>, (01/07/2014).
20. Cotran MD, Kumar V, dan Collins T. Robbins pathologic of disease, 6th ed., W.B. Saunders Company, Philadelpia; 1999. 6 – 8, 4 – 15, 102 – 110.

21. Akiyama H, Fuji K, Yamasaki O, Oon T, Iwatsuji K. Antibacterial action of several tannins against *Staphylococcus aureus*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy Lawrence. 2001; 48: 487 – 491.
22. Juliantina FR, Citra DA, Nirwani B. Manfaat Sirih Merah (*Piper crocatum*) sebagai Agen Antibakterial terhadap Bakteri Gram Positif dan Gram Negatif, JKKI; 2009. 1.
23. Brunner TJ, Wick P, Manser P, Spohn P, Grass RN, Limbach LK, Bruinink A, Stark, WJ. In vitro cytotoxicity of oxide nanoparticles: comparison to asbestos, silica, and the effect of particle solubility, Environ Sci Technol. 2006; 40: 4374 – 4381.
24. Meriç G, Dahl JE, Ruyter IE. Cytotoxicity of silica-glass fiber reinforced composites. Dent Mater. 2008; 24(9): 1201 – 1206.