

Uji sitotoksitas rebusan buah lerak (*Sapindus rarak* DC) terhadap sel *BHK-21*

Atika Rahmadina

Departemen Material Kedokteran Gigi Fakultas Kedokteran
Gigi Universitas Airlangga, Surabaya – Indonesia

Devi Rianti

Departemen Material Kedokteran Gigi Fakultas Kedokteran
Gigi Universitas Airlangga, Surabaya – Indonesia

Asti Meizarini

Departemen Material Kedokteran Gigi Fakultas Kedokteran
Gigi Universitas Airlangga, Surabaya – Indonesia

Abstract

Background. Nowadays traditional herbs are become very popular in the medicine world, and also in dentistry. Lerak fruit (*Sapindus rarak* DC) is one of herbs which is used as a traditional detergent from long time ago. The latest research shows that right now *Sapindus rarak* DC infusum could be used for an alternative foaming agent as a detergent in tooth paste because of its active substance content that is Saponin. As one of dental health product, this *Sapindus rarak* DC infusum must be accompanied by non-toxic characteristic before it distributed in the community. **Purpose.** The aim of this research is to find out the cytotoxicity of *Sapindus rarak* DC infusum to BHK-21 cells using MTT assay. **Method.** This research using post test only control group design. Each group consist of 7 replications in the 96 well microplate. Cultur cells of BHK-21 prepared in media, were divided into 4 group of well. Add 50 µl of *Sapindus rarak* DC infusum 0,625%; 1,25%; 2,5%; 5% along with BHK-21 cells. Stored the microplate into an incubator for 24 hours. Measurement of cytotoxicity was an optical density or absorbent and read with ELISA reader 620 nm. Value of absorbent in microplate showed the number of living cells in media culture. **Results.** The increasing concentration of *Sapindus rarak* DC infusum i.e. 0,625%; 1,25%; 2,5%; 5% would increase the death cells which that means increasing toxicity. **Conclusion.** The lowest concentration of *Sapindus rarak* DC infusum has the lowest cytotoxicity potential toward BHK-21 cells using MTT assay. The minimum concentration of *Sapindus rarak* DC infusum which could be used as an alternative foaming agent in toothpaste and not toxic is 1,25%.

Korespondensi:

Delvi Rianti

Department of Dental Materials,
Faculty of Dental Medicine,
Universitas Airlangga.
Jl. Mayjend. Prof. Dr. Moestopo
no. 47 Surabaya 60132,
Indonesia. E-mail: devir@fkg.
unair.ac.id

Key words: *Sapindus rarak* DC, cytotoxicity, MTT assay, fibroblast

Pendahuluan

Karies gigi masih merupakan salah satu penyakit yang banyak di derita oleh seluruh lapisan masyarakat di Indonesia. Berdasarkan laporan nasional Riskesdas (Riset Kesehatan Dasar) yang dilakukan Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan, Departemen Kesehatan RI pada tahun 2007 ditemukan sekitar 72,1 % penduduk Indonesia yang berusia 12 tahun ke atas mengalami karies gigi. Nilai tersebut mengindikasikan bahwa jumlah penderita karies gigi di Indonesia masih sangat tinggi dan perlu dilakukan upaya pencegahan. Salah satu upaya paling sederhana untuk mencegah timbulnya karies gigi adalah dengan cara menggosok gigi dua kali sehari dan menggunakan pasta gigi yang tepat.¹

Penggunaan pasta gigi sebagai *dentifrices* untuk menggosok gigi lebih efektif dalam menghilangkan debris, plak dan *stained pellicle* apabila dibandingkan dengan hanya menggunakan sikat gigi saja.² Deterjen pada pasta gigi berfungsi sebagai *foaming agent* sehingga dapat menghasilkan busa pada saat menggosok gigi. Pada umumnya pasta gigi yang beredar di pasaran sekarang ini menggunakan deterjen sintetis yaitu *sodium lauryl sulphate* (SLS).³

Buah lerak (*Sapindus rarak* DC) merupakan salah satu bahan alam yang digunakan sebagai deterjen tradisional dengan kandungan zat aktif utama saponin sehingga dapat menghasilkan busa. Penggunaan buah lerak sebagai *foaming agent* atau penghasil busa pada pasta gigi merupakan salah satu alternatif. Penggunaan bahan alam tersebut harus bersifat tidak toksik, sehingga perlu dilakukan uji sitotoksitas terhadap jaringan.⁴

Saponin dari buah lerak memiliki daya toksik yang relatif tinggi.⁵ Hasil penelitian yang telah dilakukan oleh Nevi didapatkan bahwa pemberian ekstrak dari *Sapindus rarak* DC 0,004% dan 0,006% yang mengandung saponin pada kultur sel BHK (*Baby Hamster Kidney*)-21 tidak toksik.⁶ Air rebusan *Sapindus rarak* DC konsentrasi 5 % dapat menghasilkan busa yang banyak

dan tidak pecah, sehingga dapat digunakan sebagai *foaming agent* pada pasta gigi.⁷ Penipisan kadar konsentrasi rebusan buah lerak dari 5% menjadi 2,5%; 1,25% dan 0,625% telah dapat menghasilkan busa.⁸

Berdasarkan hal tersebut di atas maka timbul permasalahan apakah rebusan buah lerak dengan konsentrasi 0,625%; 1,25%; 2,5%; 5% bersifat toksik terhadap sel BHK-21 serta berapakah konsentrasi minimal yang tidak toksik terhadap sel BHK-21 dan efektif sebagai alternatif *foaming agent* pada pasta gigi.

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui toksisitas bahan alam buah lerak sebagai alternatif *foaming agent* dalam pasta gigi dan untuk mengetahui konsentrasi minimal rebusan buah lerak yang tidak toksik terhadap sel BHK-21 menggunakan esei MTT.

Metode penelitian

Penelitian yang dilakukan merupakan suatu penelitian eksperimental laboratoris, rancangan penelitian *post test only control group design*. Penelitian dilakukan di Balai Penelitian dan Konsultasi Industri Surabaya dan Bagian PMPP Pusat Veterinaria Farma (PUSVETMA) Surabaya.

Penelitian ini menggunakan rebusan buah lerak konsentrasi 0,625%; 1,25%; 2,5%; dan 5% yang didapatkan dengan cara buah lerak segar berumur 3-4 bulan dipanen dari sentra perkebunan buah lerak Situbondo, kemudian dicuci, dibuang bijinya, dicincang dan ditimbang dengan berat 5 gr untuk mendapatkan konsentrasi 5%. Berdasarkan penelitian yang dilakukan sebelumnya 1 buah lerak setara dengan 2,5 gr. 5 gram buah lerak dimasukkan ke dalam *beaker glass* 250 ml kemudian ditambahkan dengan akuades sebanyak 100 ml. Buah lerak yang telah ditimbang sesuai dengan beratnya kemudian dimasukkan ke dalam *beaker glass* tersebut. Campuran keduanya direbus hingga mendidih dan air menjadi berwarna kuning kecoklatan, dipertahankan selama 15 menit sambil dijaga agar volume tetap 100 ml. Rebusan buah lerak dibiarkan

hingga dingin, disaring dengan kain halus hingga larutan terlihat jernih kecoklatan, didapatkan hasil 100 ml rebusan buah lerak dengan konsentrasi 5%. Untuk mendapatkan rebusan buah lerak dengan konsentrasi 0,625%; 1,25%; 2,5% dilakukan dengan cara penipisan seri yaitu konsentrasi 2,5% = 50 ml rebusan buah lerak konsentrasi 5% + 50 ml akuades, konsentrasi 1,25% = 50 ml rebusan buah lerak konsentrasi 2,5% + 50 ml akuades, konsentrasi 0,625% = 50 ml rebusan buah lerak konsentrasi 1,25% + 50 ml akuades.

Pengujian sitotoksitas dilakukan mengikuti mengikuti standar kerja di PUSVETMA, Surabaya. Pertama disiapkan kultur sel *BHK-21*, *microplate* dengan 96 *well* steril di dalam *laminar flow*. *Well* pada *microplate* diisi sel dengan kepadatan 6×10^3 dalam media kultur *Eagle's minimum essential medium* (MEM), kanamycin, (*penicilin*, *streptomycin*) penstrep 1 %, *foetal bovine serum* (FBS) 10 %, fungizone 100 unit/ml, sebanyak 100 μ l. Rebusan buah lerak 0,625%; 1,25%; 2,5%; dan 5% di filter dengan menggunakan *milipore* 0,20 μ m, diambil 50 μ l untuk setiap *well*. Disiapkan pula kontrol sel dan kontrol media. Kontrol sel adalah tiap *well* berisi sel dan media kultur saja. Kontrol media adalah tiap *well* yang berisi media kultur saja. Kemudian *microplate* di inkubasi selama 20 jam pada suhu 37° C, 5 % CO₂. *Microplate* dikeluarkan dari alat inkubasi, media di dalam *well* diambil menggunakan *syringe*, sel akan tertinggal dalam *well*. Pereaksi *MTT* dalam *PBS* yang telah difilter menggunakan *milipore* 0,20 μ m ditambahkan sebanyak 50 μ l untuk setiap *well*, kemudian di inkubasi kembali selama 4 jam agar *MTT* dapat beraktifitas metabolik. Total waktu inkubasi dalam inkubator 37° C selama 24 jam. Setelah masa inkubasi selesai, *MTT* diambil menggunakan *syringe*, kemudian ditambahkan *DMSO* sebanyak 50 μ l tiap *well* untuk menghentikan produk metabolik *MTT*. Untuk melarutkan *DMSO*, *microplate* di *shake* menggunakan *shaker* selama 5 menit. Nilai densitas optik *formazan* dibaca dengan menggunakan *ELISA reader* panjang gelombang 620 nm.

Untuk mengetahui persentase jumlah sel hidup dilakukan dengan menggunakan rumus:¹²

$$\% \text{ sel hidup} = \frac{\text{perlakuan} + \text{media}}{\text{sel} + \text{media}} \times 100$$

Data yang diperoleh ditabulasi, kemudian dilakukan pengujian statistik menggunakan *ANOVA* satu arah dengan taraf kemaknaan 5 % dan dilanjutkan dengan uji *LSD* (*Least Significant Difference*).

Hasil penelitian

Nilai densitas optik *formazan* pada rebusan buah lerak (*Sapindus rarak* DC) yang diukur menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 620 nm dapat dilihat pada tabel 1.

Dari tabel 1 tampak bahwa nilai densitas optik *formazan* semakin menurun dengan bertambahnya konsentrasi rebusan buah lerak. Persentase sel hidup *BHK-21* semakin besar dengan menurunnya konsentrasi. Probabilitas normalitas pada *Kolmogorov-Smirnov Test* secara keseluruhan menunjukkan

seluruh kelompok mempunyai nilai probabilitas normal lebih besar dari 0,05 ($p > 0,05$), artinya seluruh kelompok berdistribusi normal. Setelah diketahui semua kelompok mempunyai distribusi normal dan homogen, maka untuk mengetahui adanya perbedaan nilai densitas optik *formazan* dilakukan uji *Anova* satu arah dengan taraf kemaknaan 5%.

Hasil uji *Anova* satu arah menunjukkan ada perbedaan yang bermakna pada nilai densitas optik *formazan* masing-masing konsentrasi rebusan buah lerak (*Sapindus rarak* DC) dengan nilai probabilitas = 0,000 ($p < 0,05$). Menentukan perbedaan kemaknaan antar perlakuan terhadap kontrol maka dilakukan uji *LSD* pada $\alpha = 0,05$; yang dapat dilihat pada tabel 2.

Pengujian *LSD* pada tabel 2 menunjukkan bahwa ada perbedaan antara masing-masing kelompok konsentrasi 0,625%; 1,25%; 2,5%; 5% dan kontrol,

Tabel 1. Nilai rerata densitas optik formazan rebusan buah lerak, simpang baku, persentase sel hidup, probabilitas normalitas dan jumlah sampel.

Perlakuan	Nilai densitas optik			PN	N
	X	SD	%		
Konsentrasi 0,625%	0,3272	0,061503	90,02%	0,709	7
Konsentrasi 1,25%	0,1941	0,030383	60,53%	0,997	7
Konsentrasi 2,5%	0,1425	0,010196	49,00%	0,718	7
Konsentrasi 5%	0,1347	0,019491	47,22%	0,512	7
Kontrol Sel	0,3722	0,036026	100%	0,944	7
Kontrol Media	0,0791	0,008174	0%	0,552	7

Keterangan: X = Nilai rerata densitas optik; SD = Simpang baku; % = Persentase sel hidup; PN = Probabilitas normalitas; N = Jumlah sampel Tanda* = menunjukkan adanya perbedaan yang bermakna.

Tabel 2. Uji LSD antar perlakuan dan kontrol

Kelompok	Konsentrasi				Kontrol Sel	Kontrol Media
	0,625%	1,25%	2,5%	5%		
Konsentrasi 0,625%	-	0,000*	0,000*	0,000*	0,015*	0,000*
Konsentrasi 1,25%		-	0,006*	0,002*	0,000*	0,000*
Konsentrasi 2,5%			-	0,659	0,000*	0,001*
Konsentrasi 5%				-	0,000*	0,003*
Kontrol Sel					-	0,000*
Kontrol Media						-

yang berarti semakin tinggi konsentrasi rebusan buah lerak akan meningkatkan nilai densitas optik *formazan*.

Pembahasan

Penggunaan rebusan buah lerak (*Sapindus rarak* DC) sebagai alternatif *foaming agent* pada pasta gigi harus tidak toksik dan tidak boleh mempunyai efek merugikan terhadap tubuh manusia baik secara lokal maupun sistemik. Hal tersebut yang mendasari penelitian untuk mengetahui sitotoksitas rebusan buah lerak terhadap sel *BHK-21* menggunakan esei *MTT*.

Penduduk Indonesia telah lama menggunakan buah lerak sebagai deterjen konvensional, terutama sebagai bahan pencuci batik. Buah lerak dapat menghasilkan busa karena mempunyai bahan aktif dalam kandungannya yaitu saponin. Selain itu buah lerak juga mempunyai bahan aktif lain seperti flavonoid, tanin, dan steroid, yang telah diuji di Laboratorium Balai Penelitian dan Konsultasi Industri Surabaya.

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan menunjukkan bahwa terdapat

sejumlah sel hasil produk *MTT* yang terdeteksi dengan spektrofotometer atau *ELISA reader* dengan panjang gelombang 620 nm. Pada penelitian ini peningkatan konsentrasi rebusan buah lerak yaitu : 0,625%; 1,25%; 2,5%; 5%, akan mengakibatkan penurunan jumlah sel *BHK-21* hidup, yaitu 90,02%; 60,53%; 49,00%; 47,22%. Penurunan jumlah sel hidup tersebut kemungkinan disebabkan oleh adanya peningkatan kandungan zat aktif buah lerak antara lain saponin, yang juga semakin tinggi.

Saponin adalah senyawa kombinasi gula dan aglikon atau sapogenin yang ditemukan pada jenis tumbuhan dengan ciri utama membentuk busa apabila dilarutkan dalam air.⁵ Kandungan saponin dari buah merupakan saponin biji sabun (*soapnut saponin*) yang diketahui merupakan glikosida gula dan aglikon sapogenin. Manfaat saponin yang paling utama adalah dapat membentuk busa dalam jumlah yang cukup banyak apabila dilarutkan dalam air. Namun saponin juga mempunyai kelemahan yaitu daya toksiknya yang relatif tinggi terutama terhadap hewan perairan berdarah dingin seperti ikan.⁵

Mekanisme kerja saponin sehingga menyebabkan kematian sel sangat berhubungan erat dengan sifat saponin yang dapat menghemolisis sel darah merah.^{13,14} Hasil penelitian Gauthier *et al* mendapatkan bahwa aktivitas dan permeabilitas membran sel berkorelasi langsung dengan mekanisme terjadinya kematian sel akibat saponin.¹⁵

Proses kematian sel akibat saponin dapat dimulai dari membran plasma (jalur ekstrasik) maupun dari dalam sel (jalur intrinsik). Jalur ekstrasik dipicu oleh aktivasi reseptor spesifik pada permukaan sel dan dirangsang oleh molekul tertentu yaitu *pro-apoptotic ligands*. Pada jalur intrinsik, proses kematian sel biasanya dimulai dari respon perbedaan tipe tegangan sel, sinyal seluler yang diterima mengakibatkan kerusakan DNA, siklus sel menjadi kacau, sehingga terjadi pemecahan matriks ekstraseluler dan sel kehilangan faktor-faktor kelangsungan hidup sel. Jalur intrinsik ini juga melibatkan pelepasan enzim dari mitokondria yang dapat mengakibatkan kematian sel.¹⁶

Proses matinya sel tergantung pada kadar bahan yang berkontak dengan sel. Suatu rangsangan dapat merusak organ sel sehingga terjadi kerusakan yang bersifat reversibel maupun irreversibel. Sel yang terpapar suatu bahan melebihi batas kemampuan menerima paparan akan menyebabkan kematian sel.¹⁷ Lama inkubasi antara bahan dan sel untuk saling berkontak memerlukan waktu antara 18-24 jam.¹⁸

Pada uji sitotoksitas ini rebusan buah lerak dikontakkan langsung pada kultur sel *BHK-21* dan diinkubasi selama 20 jam, lalu ditambahkan pereaksi *MTT* dan diinkubasi kembali selama 4 jam. Hasilnya kemudian diukur menggunakan *ELISA reader* dengan panjang gelombang 620 nm. Uji ini berdasarkan kemampuan sel hidup untuk mereduksi garam *MTT* yang berwarna kuning dan larut menjadi endapan *formazan* yang berwarna biru keunguan dan tidak larut. Reduksi melibatkan enzim dari mitokondria yang merupakan bagian sel yang berperan penting dalam uji sitotoksitas ini.

Parameter sitotoksitas yang utama berdasarkan pada nilai absorbansi. Apabila

warna sel semakin pekat (biru keunguan), maka nilai absorbansi semakin tinggi yang berarti semakin banyak sel hidup. Namun bila warna sel semakin pudar, maka nilai absorbansi semakin rendah, artinya semakin banyak sel yang mati.¹⁸

Hasil penelitian ini menunjukkan kematian sel yang bermakna pada kelompok pemberian rebusan buah lerak konsentrasi 2,5% dan 5% dengan persentase nilai sel hidup secara berurutan 49,00% dan 47,22%. Kelompok pemberian rebusan buah lerak konsentrasi 1,25% dan 0,625%; didapatkan persentase nilai sel hidup 60,53% dan 90,02% yang dapat dianggap tidak toksik berdasarkan parameter CD_{50} .¹⁹ Penggunaan parameter CD_{50} pada penelitian ini karena rebusan buah lerak hanya digunakan sebagai *foaming agent* yang berkontak dengan mukosa dan bukan untuk dikonsumsi.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa nilai absorbansi tertinggi terdapat pada kelompok yang menggunakan rebusan buah lerak dengan konsentrasi 0,625% dan terendah pada kelompok yang menggunakan rebusan buah lerak konsentrasi 5%. Penelitian Nindy, menunjukkan bahwa pasta gigi yang mengandung rebusan buah lerak dengan konsentrasi 1,25%; 2,5%; 5% menghasilkan busa yang stabil, bertambah banyak dan tidak pecah. Pasta gigi menggunakan rebusan buah lerak konsentrasi 1,25% juga telah menghasilkan busa setara dengan yang dihasilkan oleh pasta gigi dengan SLS 1,5%.⁸ Komposisi SLS 1,5% merupakan konsentrasi yang banyak digunakan pada pasta gigi di pasaran.² Nilai rerata sel *BHK-21* yang hidup setelah terpapar dengan rebusan buah lerak konsentrasi 1,25% adalah 60,53% ($> CD_{50}$). Hal tersebut menunjukkan rebusan buah lerak 1,25% menghasilkan busa yang banyak dan stabil serta tidak toksik.

Sebagai simpulan dari pembahasan di atas didapatkan bahwa rebusan buah lerak dengan konsentrasi yang meningkat yaitu 0,625%; 1,25%; 2,5%; 5% akan meningkatkan sitotoksitas terhadap sel *BHK-21*. Konsentrasi minimal penggunaan rebusan buah lerak sebagai *foaming agent* pada pasta gigi yang tidak toksik adalah

1,25%. Dengan demikian penggunaan rebusan buah lerak 1,25% dapat digunakan sebagai bahan alternatif *foaming agent* pada pasta gigi.

Daftar pustaka

1. Balitbangkes (Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan) Departemen Kesehatan, Republik Indonesia Desember 2008. Riset Kesehatan Dasar (Riskesdas) 2007, Laporan Nasional 2007. Available from: <http://www.k4health.org/system/files/laporanNasional%20Riskesdas%202007.pdf>. Diakses: 29 Desember 2011.
2. Anusavice KJ. 2003. Phillip's Science of Dental Material. 11th ed. USA: Mosby Elsevier. p. 373-4.
3. Anis NBT, Jenny S, Anis I. *Penurunan sensitivitas rasa manis akibat pemakaian pasta gigi yang mengandung Sodium Lauryl Sulphate 5%*. Jurnal PDGI. 58 (2); Mei 2009, p. 11.
4. Maat S. Sterilisasi dan disinfeksi. *Ceramah sehari penyucihamaan (sterilisasi) sarana pelayanan kesehatan*. Surabaya: Patologi Klinik RSUD Dr. Soetomo. 2001. p. 14.
5. Irwansyah S. *Pemanfaatan Buah Lerak (Sapindus rarak) Sebagai Bahan Kolektor Pengawatintaan (Deinking) Kertas Perkantoran Bekas dengan Cara Flotasi*. Skripsi. Fakultas Teknologi Pertanian Institut Pertanian Bogor. 1995. p. 28-9, 57.
6. Nevi Y. *Perbedaan Sitotoksitas dan Kebersihan Dinding Saluran Akar Gigi Antara Larutan Saponin dari Buah Sapindus Rarak DC dengan larutan NaOCl 5%*. Tesis Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga Surabaya. 1999.
7. Putra IG. *Lerak Sebagai Foaming Agent Dalam Pasta Gigi*. Skripsi. Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga Surabaya. 2011.
8. Nindy IP. *Perbedaan Konsentrasi Rebusan Sapindus rarak DC Sebagai Penghasil Busa Dalam Pasta Gigi*. Skripsi. Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga Surabaya. 2011.
9. Anita Y. *Viabilitas sel fibroblas BHK-21 pada permukaan resin akrilik rapid heat cured*. Majalah kedokteran Gigi Universitas Airlangga *Dent J*. 2005;38(2); 69.
10. Freshney RI. *Culture of Animal Cells, A Manual of Basic Technique*. 2nd ed. New York: Alan R. Liss Inc. 1987. p. 9.
11. Padmi A. *Uji Sitotoksik Ekstrak Etanol 70 % Buah Kemukus (Piper cubeba L.) Terhadap Sel HeLa*. Skripsi. Fakultas Farmasi Universitas Muhammadiyah Surakarta. 2008.
12. Titien HA. *Pengaruh Tegangan Listrik dan Lama Penyinaran Pada Semen Ionomeri Gelas Modifikasi Resin Terhadap Kekerasan Permukaan dan Sitotoksik*. Tesis. Pasca Sarjana Universitas Airlangga Surabaya. 2002.
13. Melzig MF, Bader G, Loose R. Investigations of The Mechanism of Membrane Activity of Selected Triterpenoid Saponins. *Planta Med*. 2001;67:43-8.
14. Chwalek M, Ple' K, Voutquenne-Nazabadioko L. Synthesis and Hemolytic Activity of Some Hederagenin Diglycosides. *Chem. Pharm. Bull*. 2004;52:965-71.
15. Gauthier C, Legault J, Lebrun M et al. Glycosidation of Lupane-type Triterpenoids as Potent in vitro Cytotoxic Agents. *Bioorg. Med. Chem*. 2006;14:6713-25.
16. Podolak I., Galanty A., & Sobolewska D. 2010. Saponins as Cytotoxic Agents : A Review. *Phytochem Rev* (2010):9;461.
17. Hadi S. Devi R. *Uji Sitotoksitas Ekstrak Coleus amboinicus, Lour Menggunakan Esei MTT*. Majalah Kedokteran Gigi Universitas Airlangga. 2003;36:(2);56.
18. Fazwishni S. Hadijono BS. *Uji Sitotoksitas dengan Esei MTT*. Jurnal Kedokteran Gigi Universitas Indonesia. 2000;7:28-32.
19. Telli C, Serper A, Dogan A, Guc D. Evaluation of The Cytotoxicity of Calcium Phosphate Root Canal Sealers by MTT Assay. *J. Endodont*. 1999;25(12);811-3.