

Pengesahan Kertas Penapis Whatman Gred 595 sebagai Kertas Serapan untuk Persampelan Cecair Krevis Gingiva

(Validation of Whatman Filter Paper Grade 595 as Absorption Paper for Gingival Crevicular Fluid Sampling)

LEE CHIE HOW¹, LEE XIAO QING², ROHAYA MEGAT ABDUL WAHAB³, FARINAWATI YAZID³, NUR ATMALIYA
LUCHMAN⁴ & SHAHRUL HISHAM ZAINAL ARIFFIN^{5,*}

¹Klinik Pergigian Beserah, Jalan Beserah, Kampung Pelindung, 26100 Kuantan, Pahang, Malaysia

²Klinik Pergigian Setapak, Tingkat 1, Wisma Rampai, Blok Pasifik, Jalan 34/26, Taman Sri Rampai, 53300 Kuala Lumpur, Malaysia

³Jabatan Kesihatan Pergigian Keluarga, Fakulti Pergigian, Universiti Kebangsaan Malaysia, Jalan Raja Muda Abdul Aziz, 50300 Kuala Lumpur, Malaysia

⁴CytoMed Therapeutics (Malaysia) Sdn. Bhd., Bandar Baru Permas Jaya, 81750 Johor Bahru, Johor, Malaysia

⁵Jabatan Sains Biologi dan Bioteknologi, Fakulti Sains dan Teknologi, Universiti Kebangsaan Malaysia, 43600 UKM Bangi, Selangor, Malaysia

Diserahkan: 28 Julai 2024/Diterima: 22 Oktober 2024

ABSTRAK

Pengesanan penanda biologi sebagai alat diagnostik telah dikaji secara meluas. Dentin Sialofosfoprotein (DSPP) yang biasanya ditemui di dalam cecair krevis gingiva (GCF) adalah penanda biologi awal untuk pengesanan penyerapan akar gigi. Pada masa kini, kertas serapan Periopaper® adalah satu-satunya pilihan berkos tinggi yang membolehkan persampelan GCF. Antara pengganti Periopaper berkos rendah adalah kertas penapis Whatman® Gred 595 (W595). Oleh itu, kajian ini bertujuan mengesahkan kertas W595 sebagai pengganti bagi kertas Periopaper® dengan kos yang lebih rendah dan mudah diperolehi. Struktur kertas penapis W595 dikaji pada peringkat mikroskopik menggunakan Mikroskop Imbasan Elektron (SEM), diikuti dengan kualiti penyerapan menggunakan Periotron® 8000 dalam tiga selang masa iaitu T1 (0 s), T2 (15 s) dan T3 (30 s). Seterusnya, penentuan kuantiti penyerapan DSPP ditentukan oleh ELISA manakala ujian sitotoksik titisan sel MC-3T3 melalui pendekatan ujian MTT dan morfologi sel. Hasil menunjukkan bahawa struktur kedua-dua kertas adalah hampir serupa di bawah pemerhatian SEM sehingga pembesaran 200×, tetapi kertas penapis W595 sahaja menunjukkan struktur kemikroporositi di bawah pembesaran 1000×. Kualiti penyerapan pula menunjukkan kedua-dua kertas berupaya menyerap GCF pada isi padu yang sama ($p > 0.05$), serta tiada perbezaan yang signifikan ($p > 0.05$) pada kuantifikasi jumlah DSPP melalui pendekatan ELISA. Ujian kesitotoksikan menggunakan titisan sel MC-3T3 menunjukkan kedua-dua kertas mempunyai populasi peratus sel hidup melebihi 50% (IC_{50}). Sel juga didapati mengekalkan morfologi yang sama serta tiada perbezaan yang signifikan ($p > 0.05$) terhadap ketumpatan sel apabila kedua-dua kertas dikulturkan selama 72 jam. Kesimpulannya, kertas penapis W595 mempunyai mikrostruktur, kesan penyerapan GCF, potensi penyerapan molekul DSPP dan kesitotoksikan terhadap sel yang hampir sama dengan kertas Periopaper® dan boleh menggantikannya untuk pengambilan sampel GCF.

Kata kunci: Cecair krevis gingiva; Periopaper®; Whatman® Gred 595

ABSTRACT

The detection of biomarkers as a diagnostic tool has been widely studied. Dentin sialophosphoprotein (DSPP), commonly found in gingival crevicular fluid (GCF), is an early biological marker for the detection of root resorption. Currently, Periopaper® is the only absorption paper at a high cost that allows the collection of GCF samples. Therefore, this study aims to validate Whatman® Filter Paper Grade 595 (W595) as a suitable substitution of Periopaper® for lower cost and easy access. The structure of W595 was tested by microscopic observation under a scanning electron microscope (SEM), followed by its absorbent quality using Periotron® 8000 over three different time intervals, T1 (0 s), T2 (15 s) and T3 (30 s). The DSPP absorption quantity was determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) technique while the cytotoxic test of MC-3T3 cells was done by MTT and cell morphology test. Results showed that the structure of both papers were similar under 200× magnification but W595 paper had a higher microporosity under 1000× magnification. The absorption quality showed that both papers absorbed similar volumes of GCF ($p > 0.05$), and there was no significant difference ($p > 0.05$) in the amount of DSPP quantified from the sample. Cytotoxicity test using drops of MC-3T3 cells showed that both papers had a percentage population of living cells above 50% (IC_{50}). Cells maintained the same morphology

and there was no significant difference ($p>0.05$) in cell density when cultured for 72 h. In conclusion, W595 paper has characteristics similar to those of Periopaper® paper and can be used as a substitute to collect samples of GCF. The W595 paper exhibits a microstructure, GCF absorption effects, DSPP molecule absorption potential, and cytotoxicity nearly identical to Periopaper®. Therefore, W595 paper can be a suitable replacement for Periopaper® in GCF sampling.

Keywords: Gingival crevicular fluid; Periopaper®; Whatman® Grade-595

PENGENALAN

Penyakit di dalam mulut seperti karies, gingivitis, periodontitis dan lesi mulut biasanya ditemui pada pesakit yang datang ke klinik pergigian. Kebanyakan penyakit ini boleh didiagnos secara klinikal atau melalui pendekatan radiografi sebelum perancangan rawatan dapat diberikan. Walau bagaimanapun, terdapat juga sebahagian pesakit yang memerlukan pendekatan biopsi diikuti dengan analisis makmal untuk pengesahan diagnosis. Sebagai contoh, *candidiasis* oral boleh disahkan dengan melakukan pendekatan mikroskopik untuk kehadiran *Candida* di dalam sampel tisu mulut (Coronado-Castellote & Jiménez-Soriano 2013; Monsen et al. 2023). Kebanyakan pengambilan sampel untuk pengesahan diagnosis adalah bersifat invasif serta mempunyai ketepatan yang berbeza. Selain daripada pengambilan sampel tisu, pendekatan pengambilan sampel mulut yang tidak invasif juga boleh dilakukan melibatkan sampel air liur dan cecair krevis gingiva (GCF).

GCF merupakan serum transudat yang boleh digunakan untuk menentukan status kesihatan gingival atau eksudat radang yang dihasilkan oleh tisu periodontal ketika berpenyakit. GCF juga mengandungi pelbagai penanda biologi, antibodi dan bahan lain (Bostanci & Belibasakis 2018; Gupta et al. 2022; Subbarao et al. 2019). Persampelan GCF didapati boleh membantu dalam pengesanan penyakit gingiva yang tidak boleh dikesan secara klinikal dan ia dapat menilai tahap penyakit gingiva melalui pengenalan terhadap kadar aliran GCF (Barros et al. 2016; Santamaria, Sari & Nibali 2023; Silva & Gomes 2009; Wassall & Preshaw 2016). Selain itu, penyakit gingiva juga boleh dikenal pasti secara molekul melalui tahap pengekspresan penanda molekul dalam GCF, seperti interleukin-1 β (IL-1 β), matriks metalloproteinase-8 (MMP-8) dan tumor nekrosis faktor- α (TNF- α) (Bibi et al. 2021; Gupta et al. 2022; Majeed et al. 2016). Beberapa kajian menunjukkan bahawa terdapat penanda molekul yang khusus di dalam GCF iaitu Dentin Sialophosphoprotein (DSPP) yang mempunyai potensi untuk bertindak sebagai penanda awal untuk penyerapan akar gigi semasa rawatan ortodontik, seterusnya meningkatkan lagi kepentingan persampelan GCF secara klinikal (Balducci et al. 2007; Farah Amirah et al. 2020; Mohd Norzaliman et al. 2020; Tarallo et al. 2019). Terdapat pelbagai kaedah yang digunakan semasa persampelan GCF seperti penggunaan jalur kertas serapan, mikropipet, benang terpinjal pratimbang dan pencucian *crevicular* (Bibi et al. 2021; Subbarao et al. 2019). Antara kaedah ini, kertas serapan

merupakan kaedah yang paling kerap digunakan kerana kurang invasif, mudah dikendalikan dan boleh digunakan semasa sesi klinikal (Balducci et al. 2007; Farah Amirah et al. 2020; Mohd Norzaliman et al. 2020; Tarallo et al. 2019).

Kertas serapan biasanya digunakan dalam mengumpulkan sampel GCF untuk pelbagai aplikasi pergigian. Kertas serapan boleh digunakan untuk persampelan GCF daripada permukaan gigi tertentu, tempat di mana keradangan dan penyerapan tulang dijangka berlaku. Ini menjadikan persampelan GCF menggunakan kertas serapan sesuai untuk memantau perubahan berkaitan dengan keradangan dan penyerapan tulang bagi pesakit ortodontik dan aplikasinya boleh diperluaskan dalam penyelidikan lain yang memerlukan pemantauan penanda biologi atau penilaian kesihatan periodontal (Nassrawin 2018). Selain daripada penentuan kandungan isi padu GCF yang dikumpul menggunakan jalur kertas serapan, kandungan penanda molekul di dalam GCF turut boleh diukur menggunakan Periotron® (Bibi et al. 2021; Wassall & Preshaw 2016). Sebagai contoh, penanda biologi DSPP merupakan protein bukan kolagen yang sering ditemui di dalam dentin atau GCF, apabila penyerapan akar luaran berlaku, peningkatan jumlah DSPP dalam GCF boleh ditentukan melalui pendekatan ELISA (Mohd Norzaliman et al. 2020; Uma & Ahmed 2018).

Dalam kebanyakan kajian, jalur kertas serapan Periopaper® merupakan pilihan utama apabila melibatkan persampelan GCF (Silva & Gomes 2009; Subbarao et al. 2019; Tarallo et al. 2019). Walau bagaimanapun, di Malaysia, Periopaper® sukar diperoleh dan ini melibatkan penggunaan masa penghantaran yang lama untuk memperoleh kertas tersebut serta kos perbelanjaan yang tinggi. Purata harga semasa di Malaysia untuk sekotak Periopaper® (20 $\times$ 16 jalur = 320 jalur) adalah kira-kira RM230 di Malaysia. Ditambahkan lagi dengan isu wabak pandemik COVID-19 telah merumitkan lagi prosedur perolehan jalur kertas serapan Periopaper® kerana pengeluarannya berkurangan menjadikan stok di pasaran berkurangan ditambah pula dengan kesukaran pengangkutan. Menurut kajian Silva dan Gomes (2009), pengumpulan GCF menggunakan jalur kertas serapan kualitatif jenis 80 g boleh digunakan sebagai pendekatan alternatif yang sesuai pada selang masa persampelan sehingga 30 s dengan menggunakan Periotron®. Namun begitu, kajian yang menguji kertas penyerapan yang berbeza untuk mengesahkan bahan alternatif untuk pengumpulan GCF masih lagi kurang.

Kertas penapis Whatman® adalah sejenis kertas penapis berkualiti tinggi dan tebal yang diperbuat daripada gentian selulosa telah digunakan secara meluas sama ada untuk uji kaji makmal atau dalam kehidupan seharian. Ia boleh didapati dalam gred berbeza yang menunjukkan sifat yang berbeza seperti saiz liang, ketebalan dan berat (Whatman 2011). Kertas penapis Whatman® Gred-595 (W595) dikenali sebagai kertas penapis sederhana laju dengan saiz liang 4-7 µm dan mempunyai ketebalan yang sama seperti Periopaper® iaitu 160 µm (Silva & Gomes 2009; Whatman 2011). Ciri yang disenaraikan ini memberikan hipotesis bahawa kertas penapis W595 berpotensi sebagai kertas serapan alternatif kepada Periopaper® dalam pengumpulan GCF. Pada masa yang sama, kertas penapis kualitatif Whatman® lebih mudah diperolehi dan melebihi sepuluh kali lebih murah daripada Periopaper®.

Kertas serapan alternatif perlu bersifat bioserasi bagi penggunaan semasa persampelan dalam mulut pesakit. Oleh itu, ujian sitotoksiti diperlukan untuk mengesahkan keselamatan kertas penapis W595 bagi penggunaan persampelan tisu atau cecair daripada manusia. Sel titisan MC3T3-E1 merupakan sel pra-osteoblas yang diekstrak daripada muncit seringkali digunakan untuk menguji kesan sitotoksik pada sesuatu bahan seperti kertas serapan melalui menentukan keupayaan sel MC-3T3 ini berproliferasi apabila dikulturkan bersama kertas serapan (Stockert et al. 2018; Wahab et al. 2020). Penentuan sel berpoliferasi dilakukan melalui bacaan penyerapan ketumpatan optik (OD) pada 570 nm menggunakan MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide]. Pengesanan kertas serapan alternatif seperti kertas penapis W595 untuk pengumpulan GCF boleh memberikan manfaat dan memudahkan prosedur klinikal, terutamanya pada keadaan Periopaper® sukar diperolehi. Sehingga kini, tiada kajian yang telah dibuat untuk menilai dan membandingkan ciri mikrostruktur kertas penapis W595 berbanding kertas serapan Periopaper® di bawah Mikroskop Imbasan Elektron (SEM), keberkesanan kertas dalam mengumpul dan mengesan penanda molekul GCF serta tahap kesesuaian bioserasi kedua-dua kertas.

Permasalahan kajian ini adalah disebabkan oleh kos yang tinggi serta sukar untuk diakses apabila melibatkan penggunaan kertas Periopaper® semasa pengambilan GCF merupakan salah satu daripada halangan utama dalam kajian melibatkan penyelidikan pergigian pada masa kini. Hasil kajian ini yang menggunakan kertas penapis W595 dapat mengatasi masalah kos kertas penyerapan yang tinggi serta mudah didapati oleh penyelidik dan pakar klinikal melibatkan pensampelan GCF. Kajian ini adalah untuk mengenal pasti kertas serapan alternatif yang mempunyai struktur fizikal, kualiti serapan dan bersifat bioserasi berbanding kertas serapan sedia ada di pasaran iaitu Periopaper® (kertas kawalan) bagi mengesahkan kertas W595 (kertas ujian) boleh digunakan sebagai pengganti kepada kertas Periopaper® untuk pengumpulan sampel GCF.

BAHAN DAN KAEDAH

KERTAS PENYERAPAN DAN KELULUSAN ETIKA

Dalam kajian ini, kertas kawalan adalah kertas serapan Periopaper® (Oraflow Inc., Plainview, NY, USA) dan kertas ujian pula merupakan kertas penapis Whatman® Gred 595 (W595) daripada Global Life Sciences Solution, Marlborough, USA. Kedua-dua kertas digunakan untuk perbandingan sifat-sifatnya antara satu sama lain di Makmal Proteomik, Fakulti Pergigian, Universiti Kebangsaan Malaysia (UKM). Prosedur kajian ini dilakukan mengikut garis panduan Jawatankuasa Etika Penyelidikan Universiti Kebangsaan Malaysia yang telah diluluskan (UKM PPI/111/8/JEP-2021-870).

SAIZ SAMPEL KAJIAN

Perisian G*Power digunakan untuk pengiraan saiz sampel yang sesuai untuk kajian ini. Menurut kajian yang dilakukan oleh Silva dan Gomes (2009), saiz sampel dikira daripada perbezaan min dan sisihan piawai yang ditentukan sebagai 0.389 daripada kajian lepas untuk digunakan dalam kajian ini dengan kuasa 80% ($\beta = 0.2$), alfa 0.05. Oleh itu, berdasarkan pengiraan ini, jumlah saiz sampel yang dikira adalah sekurang-kurangnya 166 sampel diperlukan untuk kajian ini.

Jalur kertas serapan Periopaper sebagai kertas kawalan dan kertas penapis W595 (kertas ujian) setiap satunya juga diambil untuk analisis pemerhatian mikroskopik struktur kertas melalui SEM. Dalam kajian ini 90 jalur digunakan pada setiap kertas (kertas serapan Periopaper® dan kertas penapis W595). Oleh itu, untuk melibatkan nilai min bagi 3 uji kaji berlainan pada kedua-dua kertas, maka sejumlah 180 jalur diperlukan untuk pengukuran isi padu serapan.

Bagi kajian pengesanan DSPP menggunakan kit ELISA pula, setiap jenis kertas memerlukan 6 jalur menjadikan sebanyak 12 jalur lagi yang digunakan. Ujian sitotoksik titisan sel MC-3T3 pula melibatkan 9 jalur pada setiap selang masa bagi setiap jenis kertas menjadikan bilangan jalur yang digunakan oleh kedua-dua jenis kertas bagi ujian sitotoksiti adalah sebanyak 54 jalur (Kertas serapan Periopaper: 27 jalur dan kertas penapis W595: 27 jalur). Oleh itu, secara keseluruhannya sejumlah 246 jalur telah digunakan kesemuanya dengan setiap jenis kertas serapan Periopaper® dan kertas penapis W595 memerlukan sebanyak 123 jalur.

PENYEDIAAN GCF BUATAN

GCF buatan telah disediakan mengikut kaedah Dalwai, Spratt dan Pratten (2006) bermula dengan larutan campuran yang terdiri daripada 60% medium kultur tisu RPMI dan 40% serum kuda. Medium RPMI memainkan peranan dalam menyediakan nutrien yang terdapat dalam eksudat tisu manusia. Oleh itu, medium RPMI mewakili komponen utama GCF. Kemudian, 0.5 µg/mL menadione dan 5.0 µg/mL haemin ditambahkan ke dalam larutan campuran

bagi menghasilkan GCF tiruan. Akhir sekali, bagi proses penentuan kehadiran penanda biologi, sebanyak 10 mg DSPP dimasukkan ke dalam 150 mL GCF buatan.

JALUR KERTAS PENAPIS W595

Kertas penapis W595 dipotong mengikut dimensi Periopaper® iaitu 2.55 mm lebar dan 14.19 mm panjang, menggunakan pemotong kertas seperti yang ditunjukkan dalam Rajah 1. Menurut Silva dan Gomes (2009), ukuran bahagian pengendalian Periopaper® yang ditutup dengan balutan oren ialah 8.07 mm. Untuk menghasilkan bahagian pengendalian pada kertas penapis W595 (kertas ujian) menyerupai bahagian pengendali pada Periopaper® (kertas kawalan), pita selofan merah digunakan untuk membalut sehingga 8.07 mm pada kertas penapis W595 dengan setiap jalur digunakan dalam persampelan kajian ini (Rajah 1 (iv)).

PENGIMEJAN MIKROSKOP IMBASAN ELEKTRON

Jalur kertas kawalan (kertas serapan Periopaper®) dan kertas ujian (kertas penapis W595) telah dihantar ke Makmal Unit Instrumentasi, Penyelidikan dan Pengurusan Instrumentasi (iCRIM), Bangi untuk analisis pengimejan

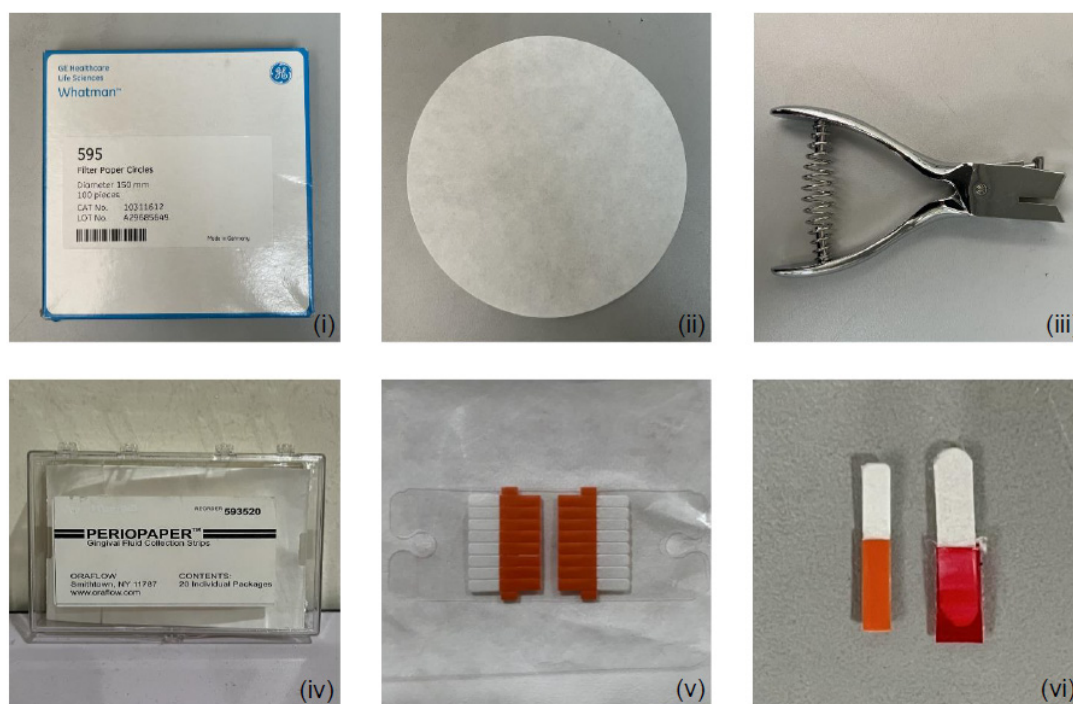
SEM. Jalur kertas serapan Periopaper® dan kertas penapis W595 dianalisis menggunakan SEM tekanan berubah-ubah yang dilengkapi dengan elektron berselerak belakang (BSE) dan pengesan (Bicchieri et al. 2019). Imej SEM telah direkodkan dan susunan gentian dibandingkan antara kedua-dua jenis kertas.

PENGUKURAN ISI PADU CECAIR KREVIS GINGIVA PADA SELANG MASA BERBEZA

Pengukuran isi padu cecair krevi gingiva (GCF) buatan diukur sebanyak tiga kali pada selang masa T1 (pengumpulan), T2 (selepas 15 s) dan T3 (selepas 30 s) (Silva & Gomes 2009). Persampelan GCF dilakukan menggunakan jalur kertas serapan Periopaper® sebagai kawalan dan dibaca menggunakan Periotron® 8000 (Oralflo Inc., NY, USA) pada tiga selang masa yang telah ditetapkan. Prosedur yang sama juga dilakukan untuk jalur kertas ujian iaitu kertas penapis W595.

UJIAN ASAI IMUNOJERAPAN BERPAUT ENZIM (ELISA)

Kit ELISA DSPP Manusia (Wuhan Fine Biotech Co., Ltd) digunakan untuk menganalisis kandungan DSPP yang diserap oleh kedua-dua jalur kertas penapis W595



RAJAH 1. Kertas penapis Whatman® W595 dan kertas serapan Periopaper®. (i) Pembungkusan asal dan (ii) kertas penapis W595 berbentuk bulat dengan diameter 150 mm. (iii) Pemotong kertas komersial digunakan untuk memotong W595. (iv) Pembungkusan asal Periopaper® dan (v) kertas serapan Periopaper®. (vi) Perbandingan bentuk dan saiz antara kertas serapan Periopaper® (kiri) dan kertas penapis W595 (kanan)

(kertas ujian) dan jalur kawalan Periopaper®. Larutan piawai dan sampel ujian telah disediakan sebelum diuji. Bagi larutan piawai, 1 mL Penimbal Pencairan Sampel (PPS) telah dicampurkan ke dalam tiub piawai yang mengandungi 20 ng DSPP rekombinan manusia sebagai larutan stok. Kemudian, enam tiub yang mempunyai kepekatan 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32 dan 1/64 daripada tiub piawai disediakan melalui pendekatan pencairan melibatkan larutan stok dan PPS. Kawalan negatif dalam kajian ELISA merupakan tiub yang hanya mengandungi PPS sahaja.

Bagi sampel ujian pula, jalur kertas serapan Periopaper® sebagai kertas kawalan dan kertas penapis W595 (kertas ujian) digunakan untuk mengumpul GCF tiruan dan kertas ini diletakkan ke dalam telaga berasingan plat mikro 96-telaga. Sebanyak 200 µL penimbal salin fosfat (PBS) telah dicampurkan ke dalam telaga, diikuti dengan 100 µL sampel dimasukkan ke dalam setiap telaga mengikut kesesuaian. Plat mikro 96-telaga kemudiannya ditutup dengan penutup, diinkubasi pada 37 °C selama 90 minit dan seterusnya dibasuh sebanyak dua kali menggunakan penimbal basuh. Kemudian, 100 µL larutan antibodi berlabel Biotin dimasukkan ke dalam setiap telaga, ditutup, seterusnya diinkubasi pada 37 °C selama 60 minit. Plat mikro 96-telaga dibasuh sebanyak tiga kali selepas diinkubasi dan 100 µL larutan SABC dimasukkan ke dalam setiap telaga, ditutup dan diinkubasi lagi pada 37 °C selama 60 minit. Seterusnya, plat dibasuh sebanyak lima kali dan 90 µL substrat TMB ditambah ke dalam setiap telaga. Plat mikro 96-telaga kemudian ditutup dan diinkubasi pada suhu 37 °C dalam gelap selama 20 minit. Akhir sekali, 50 µL larutan berhenti dimasukkan ke dalam setiap telaga bagi menghentikan tindak balas. Warna campuran larutan yang bertukar kuning dengan serta-merta diukur penyerapan ketumpatan optik (OD) pada panjang gelombang 450 nm menggunakan pembaca plat mikro ELISA (Varioskan Flash Model 680, Thermo).

UJIAN SITOTOKSISITI MENGGUNAKAN UJIAN MTT

Kesan sitotoksik bagi kedua-dua jalur kertas serapan Periopaper® (kertas kawalan) dan kertas penapis W595 (kertas ujian) dinilai menggunakan ujian MTT. Titisan sel pra-osteoblas MC3T3-E1 subklon C14 (MC3T3-E1/C14) (Nombor ATCC: CRL-2596™) daripada mencit telah digunakan dalam kajian ini. Sel MC-3T3 dikulturkan dalam medium lengkap untuk pengkulturan yang mengandungi medium asas MEM (Gibco, Grand Island, NY, Amerika Syarikat), 15% (v/v) serum janin lembu (FBS) (Gibco, Grand Island, NY, Amerika Syarikat), 1% (v/v) penisilin/streptomisin (Gibco, Grand Island, NY, USA) dan 1 mM Natrium Piruvat (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA).

Sel MC-3T3 dikulturkan pada plat mikro 24-telaga dengan setiap telaga mempunyai ketumpatan 20,000 sel/cm². Sel MC-3T3 telah didedahkan kepada jalur kertas serapan Periopaper® dan W595 secara berasingan selama

24, 48 dan 72 jam inkubasi pada 37 °C, 5% CO₂, 95% kelembapan relatif. Pada setiap selang masa yang telah ditentukan ini, medium yang sedia ada dikeluarkan dan diganti dengan 600 uL medium lengkap dan larutan MTT (9:1) diikuti dengan 4 jam pengeraman tambahan.

Seterusnya, medium dikeluarkan dengan berhati-hati, diikuti dengan penambahan 220 µL penimbal Glisine-DMSO (1: 8) pada setiap telaga. Plat mikro 24-telaga digoncang menggunakan penggoncang inkubator pada suhu 37 °C selama 1 minit. Sebanyak 200 uL larutan dari setiap telaga yang diuji dipindahkan ke dalam plat mikro 96-telaga untuk pengukuran penyerapan OD pada 570 nm dengan pembaca plat mikro Flash Varioskan® (Thermo Fisher Scientific, USA) (Ariffin et al. 2014; Wahab et al. 2020). Ujian sitotoksiti dilakukan melibatkan tiga uji kaji yang berlainan (n=3).

ANALISIS STATISTIK

Perisian IBM Statistik versi 22.0 (IBM, USA) telah digunakan untuk semua analisis statistik. Analisis pengukuran isi padu GCF menggunakan jalur kertas serapan Periopaper® dan W595 pada selang masa yang berbeza (T1, T2 dan T3) dilakukan dengan mengenal pasti bacaan min Periotron manakala Ujian-T digunakan untuk membandingkan isi padu antara jalur kertas serapan Periopaper® dan W595.

Analisis ANOVA pula digunakan untuk mengenal pasti sama ada jenis kertas serapan dan selang masa yang berbeza (T1, T2 dan T3) akan menghasilkan sebarang perbezaan yang ketara atau signifikan ($p < 0.05$) pada bacaan Periotron®. Bagi analisis DSPP ELISA pula, min keputusan penyerapan OD yang diperoleh menggunakan kedua-dua jenis kertas ditentukan dan perbandingan antara min kedua-dua kertas dilakukan oleh Ujian-T pada tahap keyakinan 95% ($p < 0.05$). Bagi ujian sitotoksiti menggunakan ujian MTT pula analisis statistik dilakukan juga menggunakan Ujian-T dengan tahap keyakinan 95% ($p < 0.05$).

KEPUTUSAN

IMEJ MIKROSKOP IMBASAN ELEKTRON (SEM) PERIOPAPER® DAN KERTAS PENAPIS WHATMAN® GRED 595

Berdasarkan imej SEM bagi kedua-dua jalur kertas serapan Periopaper® dan kertas penapis Whatman® Gred 595 (W595), struktur, susunan dan ketumpatan mikrofibril secara amnya adalah serupa (Rajah 2). Walau bagaimanapun, kertas penapis W595 secara mikroskopik mempunyai struktur yang lebih berliang berbanding Periopaper®. Pada pembesaran 50×, kertas penapis W595 mempunyai lebih ruang di antara gentian berbanding dengan Periopaper® (Rajah 2). Untuk pembesaran 200× pula, kertas serapan Periopaper® dan kertas penapis

W595 menunjukkan ciri yang hampir sama pada susunan penyambung silang fibril, ruang di antara gentian, serta ketumpatan gentian (Rajah 2). Perbezaan ciri yang paling ketara ditunjukkan di bawah pembesaran 1000 $\times$ dengan kertas penapis W595 menunjukkan struktur mikroporositi di sepanjang mikrofibril dan struktur mikroporositi ini tidak kelihatan pada kertas serapan Periopaper® (Rajah 3).

KUALITI PENYERAPAN

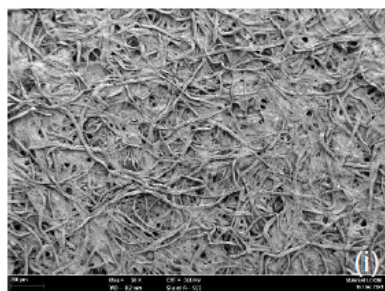
Jadual 1 menunjukkan keputusan pengukuran isi padu GCF pada selang masa yang berbeza menggunakan jalur kertas serapan Periopaper® dan W595. Min bacaan Periotron untuk jalur kertas serapan Periopaper® (kertas kawalan) adalah 152.23 ± 36.46 bagi T1, 131.71 ± 27.82 bagi T2, 114.5 ± 30.05 bagi T3 manakala untuk jalur kertas serapan W595 (kertas ujian) pula adalah pada 163.48 ± 31.52 (T1), 133.93 ± 42.88 (T2) dan 125.38 ± 41.50 (T3).

Tiada perbezaan yang signifikan ($p > 0.05$) didapati pada bacaan Periotron® antara kedua-dua jalur kertas pada tiga selang masa berbeza menggunakan Ujian-T. Ini turut dibuktikan oleh nilai saiz kesan delta Glass ($d < 0.05$) yang mencadangkan kepentingan praktikal yang rendah, yang menunjukkan kandungan serapan GCF adalah sama di antara jalur kertas serapan Periopaper dan W595. Analisis ANOVA pula menunjukkan perbezaan yang signifikan ($p < 0.05$) dalam bacaan Periotron® pada tiga selang masa yang berbeza iaitu sela masa T1, T2 dan T3 (Jadual 2).

PENYERAPAN DSPP

Jadual 3 menunjukkan min dan sisihan piawai untuk kertas serapan Periopaper® dan kertas W595, diikuti dengan Ujian-T yang membandingkan kedua-dua min. Tiada perbezaan yang signifikan ($p > 0.05$) didapati antara keputusan bagi kedua-dua jalur kertas serapan Periopaper® dan W595 dalam penyerapan DSPP.

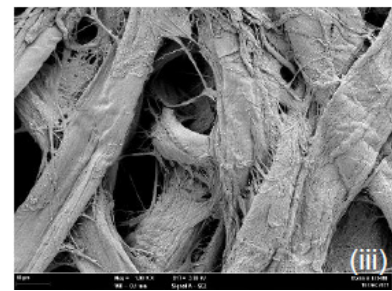
Kertas serapan Periopaper® (kertas kawalan)



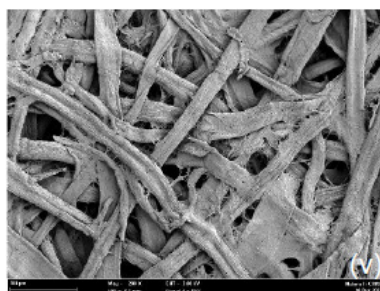
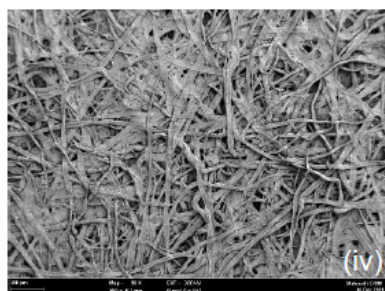
50 $\times$



200 $\times$

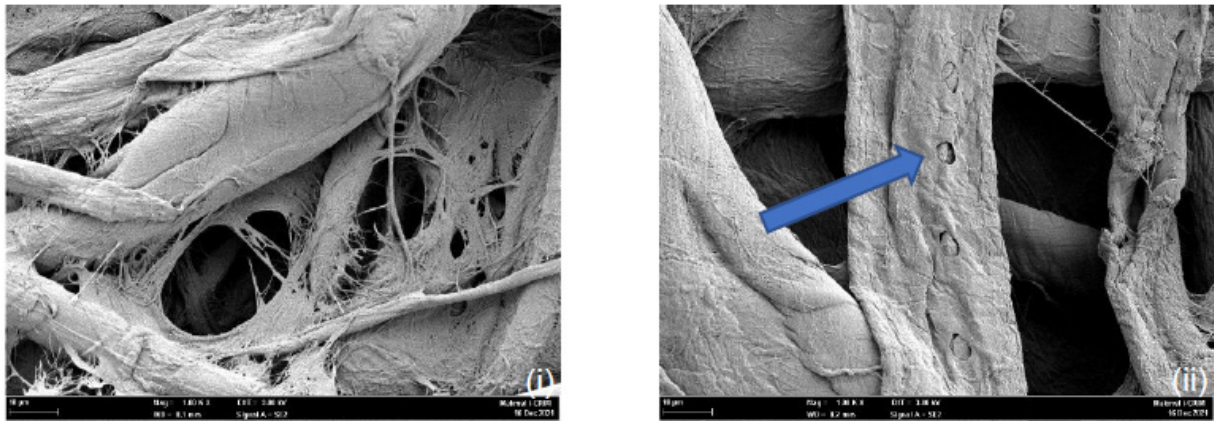


1000 $\times$



Kertas penapis W595 (kertas ujian)

RAJAH 2. Analisis Mikroskop Imbasan Elektron (SEM) kertas serapan Periopaper® (kertas kawalan) dan W595 (kertas ujian). Imej mikroskopik oleh SEM pada kertas serapan Periopaper® (i, ii, iii) dan kertas penapis W595 (iv, v, vi) masing-masing di bawah pembesaran 50 $\times$, 200 $\times$ dan 1000 $\times$



RAJAH 3. Struktur mikroporositi kertas. Perbandingan antara kertas serapan Periopaper® (kertas kawalan) (i) dan kertas penapis W595 (kertas ujian) (ii) di bawah pembesaran 1000x. Struktur liang mikroporositi yang terdapat pada kertas penapis W595 manakala tiada struktur mikroporisiti pada kertas serapan Periopaper®. Struktur liang mikroporisiti dilabelkan dengan anak panah

JADUAL 1. Nilai min bacaan Periotron bagi kertas serapan pada tiga selang masa yang berbeza

Selang masa	Kertas serapan	Min $\pm$ Sisihan piawai	Perbezaan min (μ l)	Nilai p (Ujian-t)	Saiz kesan (Glass' delta)
T1	Periopaper (Kawalan)	152.23 $\pm$ 36.46	-11.25	0.470	0.308553
	W595	163.48 $\pm$ 31.52			
T2	Periopaper (Kawalan)	131.71 $\pm$ 27.82	-2.22	0.892	0.079809
	W595	133.93 $\pm$ 42.88			
T3	Periopaper	114.5 $\pm$ 30.05	-10.88	0.510	0.36209
	W595	125.38 $\pm$ 41.50			

Selang masa T1 (pengumpulan atau 0 minit), T2 (15 s) dan T3 (30 s). *Signifikan secara statistik pada $p < 0.05$. Data berdasarkan 3 uji kaji berasingan dengan setiap uji kaji melibatkan penggunaan 6 jalur kertas bagi setiap selang masa

JADUAL 2. Perbezaan min bacaan GCF buatan menggunakan Periotron bagi kertas serapan pada tiga selang masa yang berbeza menggunakan analisis ANOVA

Selang masa	Selang masa	Perbezaan min (μ l)	Nilai p	95% CI (LL, UL)
T1	T2	25.04	< 0.001*	(16.519, 33.551)
	T3	37.92	< 0.001*	(30.547, 45.283)
T2	T1	-25.04	< 0.001*	(-33.551, -16.519)
	T3	12.88	< 0.001*	(6.363, 19.397)
T3	T1	-37.92	< 0.001*	(-45.283, -30.547)
	T2	-12.88	< 0.001*	(-19.397, -6.363)

Selang masa T1 (pengumpulan atau 0 minit), T2 (15 s) dan T3 (30 s). CI; Selang keyakinan, LL; Tahap Bawah, UL; Tahap Atas *Signifikan secara statistik pada $p < 0.05$

JADUAL 3. Min dan sisihan piawai untuk bacaan penyerapan ketumpatan optik (OD) bagi kertas kawalan (kertas serapan Periopaper®) dan kertas ujian (kertas penapis W595) bagi kehadiran penanda molekul DSPP melalui pendekatan ELISA

Kertas serapan	N	Min ± Sisihan piawai (penyerapan OD pada 450 nm)	Perbezaan min	Nilai p
				Ujian-t
Periopaper®	6	0.274 ± 0.015	-0.008	0.45
W595	6	0.282 ± 0.019		

N; bilangan ujian dilakukan. *Signifikan secara statistik pada $p < 0.05$

UJIAN SITOTOKSISITI DAN MORFOLOGI TITISAN SEL MC-3T3

Analisis keputusan ujian sitotoksiti menunjukkan purata sel hidup untuk titisan sel MC-3T3 bagi kedua-dua kertas iaitu kertas serapan Periopaper® sebagai kertas kawalan manakala kertas penapis W595 sebagai kertas ujian kultur bersama sel titisan MC-3T3 selama 24, 48 dan 72 jam. Kesemua sel yang dikultur dengan kertas kawalan dan kertas ujian didapati lebih tinggi daripada 50% populasi sel hidup (IC_{50}), seperti yang ditunjukkan dalam Rajah 4. Kawalan negatif dalam ujian sitotoksik ini adalah telaga yang terdapat hanya sel MC-3T3 sahaja tanpa sebarang kertas dianggap mengandungi 100% sel hidup manakala kawalan positif pula melibatkan sel MC-3T3 yang dikultur dengan kertas Periopaper®.

Rajah 5 pula menunjukkan imej populasi sel MC-3T3 di bawah mikroskop SEM selepas tempoh inkubasi yang berbeza iaitu 24, 48 dan 72 jam. Imej mikroskopik menunjukkan bahawa morfologi sel MC-3T3 sepanjang pendedahan dengan kertas Periopaper® (Rajah 5(i), 5(ii) & 5(iii)) dan kertas W595 (Rajah 5(iv), 5(v) & 5(vi)) masih mengekalkan morfologi fibroblas normal seperti sel di dalam kultur tanpa kertas (Rajah 5(vii), 5(viii) & 5(ix)).

Daripada segi ketumpatan sel pula, sepanjang 72 jam rawatan, ketumpatan sel melalui bacaan min penyerapan OD bagi kedua-dua kertas didapati meningkat (Jadual 4). Kesemua populasi sel yang dirawat menunjukkan peningkatan penyerapan OD yang stabil apabila tempoh inkubasi meningkat. Analisis Ujian-T mendapati tiada perbezaan yang signifikan ($p=0.601$) antara bacaan penyerapan OD kertas serapan Periopaper® (kertas kawalan) dan kertas ujian W595 (Jadual 4). Oleh itu, sel MC-3T3 yang mempunyai peratus populasi sel hidup yang lebih tinggi daripada 50% ($>IC_{50}$) di samping masih mengekalkan morfologi sel fibroblas serta peningkatan sel hidup yang hampir sama pada kedua-dua kertas sepanjang rawatan dari 24 jam hingga 72 jam menunjukkan bahawa kertas ujian (W595) tidak mempunyai kesan sitotoksik dan bersifat bioserasi seperti kertas kawalan iaitu kertas Periopaper®.

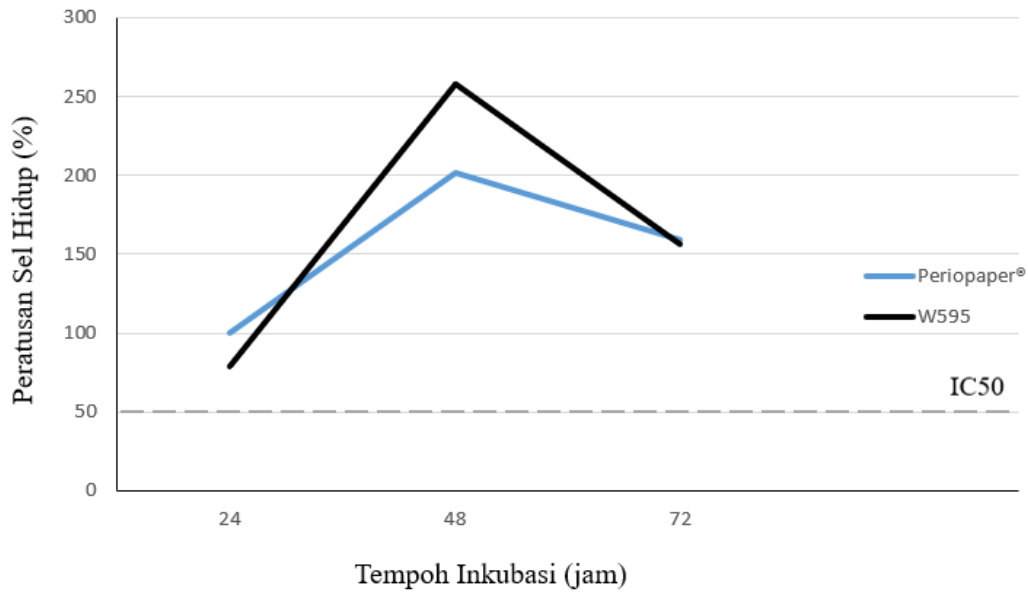
PERBINCANGAN

Kos yang tinggi serta sukar untuk diakses melibatkan kertas Periopaper® merupakan salah satu daripada

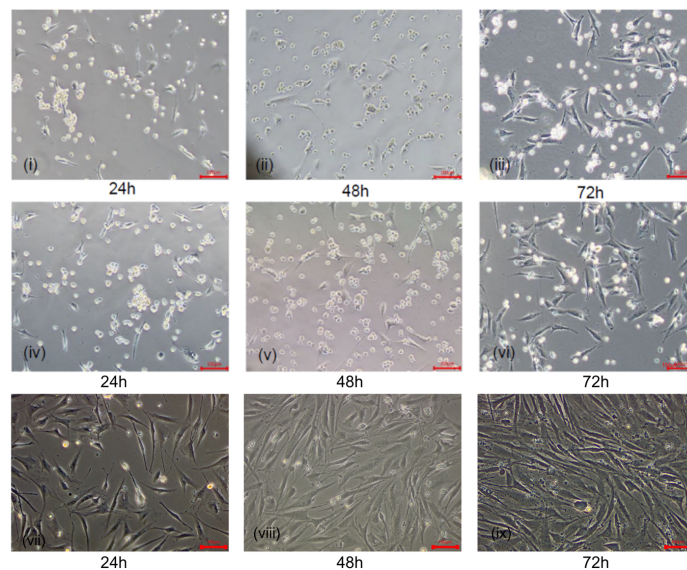
masalah dalam kajian penyelidikan pergigian. Kajian ini menggunakan kertas penapis W595 sebagai pengganti kepada Periopaper® dan dijangka dapat membantu daripada segi kos yang rendah serta mudah diperolehi oleh penyelidik dan pakar klinikal melibatkan pensampelan GCF. Keputusan SEM mendapati struktur fizikal kedua-dua kertas kawalan (Kertas Periopaper®) dan ujian (kertas penapis Whatman®; W595) pada peringkat mikroskopik menunjukkan saiz, susunan, dan ketumpatan mikrofibril bagi kedua-dua kertas adalah hampir serupa. Hanya satu perbezaan yang ketara iaitu dengan kehadiran struktur mikroporositi pada mikrofibril tertentu pada kertas penapis W595 dan struktur mikroporositi ini tidak ditemui dalam kertas serapan Periopaper®.

Keputusan bacaan Periotron® pada kedua-dua kertas yang dipipet dengan GCF tiruan menunjukkan keputusan yang sama dan tiada perbezaan yang signifikan antara kedua-dua jenis jalur kertas serapan. Dengan ini, dapat disimpulkan bahawa keupayaan penyerapan untuk kedua-dua kertas serapan Periopaper® dan W595 adalah sama. Walau bagaimanapun, terdapat perbezaan yang signifikan ($p<0.001$) pada bacaan Periotron® apabila kertas diukur pada selang masa yang berbeza (T1, T2 dan T3) melibatkan kedua-dua kertas serapan Periopaper® dan W595. Keputusan menunjukkan bahawa bacaan Periotron® lebih rendah apabila melibatkan selang masa yang lebih panjang (T3) pada kedua-dua kertas. Hal ini mungkin disebabkan oleh berlakunya penyejatan GCF tiruan dalam masa antara pengumpulan GCF dan pengukuran menggunakan Periotron®. Walau bagaimanapun, keputusan ini tidak seiring dengan kajian yang dilakukan oleh Silva dan Gomes (2009), yang menunjukkan tiada perbezaan yang signifikan antara selang masa yang berbeza.

Untuk ujian penyerapan penanda biologi DSPP pula mendapati kertas serapan Periopaper® (kertas kawalan) dan W595 (kertas ujian) yang digunakan untuk mengumpul GCF tiruan yang mengandungi DSPP. Kandungan DSPP yang diserap pada kedua-dua kertas telah diekstrak dan dicairkan untuk ujian DSPP ELISA. Mengikut keputusan kajian, tiada perbezaan yang signifikan ($p>0.05$) pada bacaan penyerapan OD pada pendekatan ELISA antara kertas serapan Periopaper® dan W595 yang menunjukkan bahawa kedua-dua kertas kawalan dan kertas ujian mempunyai keupayaan yang sama dalam menyerap penanda biologi DSPP. Ini penting kerana DSPP berfungsi



RAJAH 4. Peratus sel hidup bagi titisan sel pra-osteoblas MC3T3-E1 yang dikultur dengan kertas kawalan iaitu kertas serapan Periopaper® dan kertas penapis W595. Sel tanpa sebarang rawatan adalah kumpulan kawalan dengan peratus sel hidup dianggap sebagai 100%. Sel yang dirawat dengan kedua-dua kertas mempunyai peratus sel hidup lebih tinggi daripada 50%. Analisis sitotoksik ini adalah berdasarkan kepada nilai purata daripada 3 uji kaji yang berlainan (n=3)



RAJAH 5. Analisis morfologi titisan sel MC-3T3 pada kertas kawalan iaitu kertas Periopaper® dan kertas ujian iaitu kertas penapis Whatman® W595. Imej mikroskopik populasi sel MC-3T3 yang didedahkan dengan kertas kawalan iaitu kertas serapan Periopaper® (i, ii, iii) dan kertas ujian iaitu kertas penapis W595 (iv, v, vi) pada jangka masa inkubasi seperti yang dilabelkan. Kawalan merupakan sel MC-3T3 yang dikulturkan tanpa kertas (vii, viii, ix) masing-masing pada 24 jam, 48 jam dan 72 jam. Populasi sel MC-3T3 mengekalkan morfologi sel fibroblas sepanjang 72 jam pendedahan pada kedua-dua jenis kertas. Bar skala di bawah setiap rajah (i-v) menunjukkan 100 μ m

JADUAL 4. Min, nilai sisihan piawai dan keputusan Ujian-t bacaan bilangan sel hidup daripada penyerapan OD pada 570 nm untuk ujian sitotoksik menggunakan Ujian MTT

Tempoh inkubasi (jam)	Kertas serapan	Bilangan sel hidup Min (10^7)	Nilai p (Ujian-t)
24	Periopaper	1.66	0.386
	W596	1.31	
48	Periopaper	3.35	0.512
	W596	4.30	
72	Periopaper	2.65	0.969
	W596	2.61	

*Signifikan secara statistik pada $p < 0.05$

sebagai penanda molekul yang berpotensi untuk mengesan penyerapan akar semasa rawatan ortodontik dan kehadiran DSPP dapat dikesan melalui analisis ELISA (Mohd Norzaliman et al. 2020; Uma & Ahmed 2018).

Ujian sitotoksiti terhadap titisan sel MC-3T3 menggunakan pendekatan ujian MTT telah membuktikan bahawa kertas penapis W595 selamat untuk kegunaan manusia dan mempunyai sifat bioserasi kerana sel yang dikulturkan di bawah rawatan kertas penapis W595 sentiasa melebihi nilai IC_{50} sepanjang 72 jam rawatan. Titisan sel MC-3T3 juga didapati mengekalkan morfologi sebagai sel fibroblas di sepanjang 72 jam rawatan. Kajian oleh Farinawati et al. (2022) menggunakan sel MC-3T3 terhadap perancah hidroksiapatit sama ada tanpa kehadiran (sel kawalan) dan kehadiran 100 ug/mL askorbik asid (sel rawatan) mendapati sel ini mengekalkan morfologi sel fibroblas sehingga menjadi konfluen masing-masing pada 6 dan 9 hari pengkulturan menunjukkan sifat bioserasi perancah hidroksiapatit serta tidak mempunyai sifat sitotoksik terhadap sel. Ciri yang bersifat bioserasi iaitu populasi sel hidup mengekalkan morfologi sel fibroblas dan melebihi nilai IC_{50} (50% populasi sel hidup) ini juga ditunjukkan oleh kertas kawalan iaitu kertas serapan Periopaper®. Perbandingan terhadap ketumpatan sel yang dikultur pada kedua-dua kertas ini juga tidak menunjukkan perbezaan yang signifikan. Sel MC-3T3 sering juga digunakan dalam ujian sitotoksiti melibatkan pelbagai bahan untuk rawatan pergigian seperti 7 jenis logam yang sering digunakan semasa rawatan gigi (Contreras et al. 2010), 2 jenis bahan (CeraSeal, BioRoot™ dan AH Plus®) yang digunakan semasa rawatan endodontik (de Almeida-Junior et al. 2024) dan serbuk tulang sotong (Vajrabhaya, Korsuwannawong & Surarit 2019). Selain daripada titisan sel MC-3T3 terdapat juga jenis sel lain yang digunakan di dalam ujian sitotoksiti seperti sel primer daripada sel stem darah periferi manusia (Intan Zarina et al. 2020), titisan sel normal, V79-4 daripada *Chinese Hamster* jantan (Arnida Hani et al. 2022) dan titisan sel leukemia manusia, K562 (Sharifah Nadhira et al. 2023).

Kajian ini dilakukan untuk mengatasi kos yang tinggi melibatkan penggunaan kertas Periopaper® semasa pengambilan GCF. Objektif kajian ini adalah untuk menyediakan dan menentusahkan kertas penapis W595

sebagai pengganti kepada kertas Periopaper® yang lebih berpatutan serta mudah didapati oleh penyelidik dan pakar klinikal. Kajian ini melibatkan perbandingan struktur fizikal pada peringkat mikro, keupayaan serapan GCF, penyerapan penanda biologi DSPP dan kesitotoksikan kedua-dua kertas semasa pengambilan sampel GCF. Oleh itu, justifikasi kajian adalah pada potensi Kertas Penapis W595 dalam menyumbang kepada kemajuan pengesanan dan diagnosis molekul penanda terutama dalam penyelidikan pergigian. Namun begitu, terdapat beberapa kekangan pada kajian ini, seperti jalur kertas penapis W595 yang tidak dipotong mengikut dimensi yang tepat seperti jalur kertas serapan Periopaper® disebabkan oleh jenis pemotong kertas komersial yang digunakan bersaiz lebih besar. Oleh itu, saiz kertas penapis W595 sedikit berbeza berbanding kertas serapan Periopaper®. Hal ini mungkin akan menyebabkan sedikit perubahan dalam keputusan ujian terutama kepada kandungan isi padu GCF dan penanda DSPP walaupun saiznya secara amnya adalah hampir sama.

KESIMPULAN

Kajian ini telah mengesahkan bahawa kertas penapis Whatman® Gred 565 (W595) boleh digunakan sebagai kertas alternatif menggantikan Periopaper® dalam pengumpulan sampel cecair krevis gingiva (GCF). Analisis mikrostruktur mendapati kedua-dua kertas mempunyai struktur yang hampir sama, menyerap GCF dengan berkesan dan tiada perbezaan yang ketara terhadap kuantiti penyerapan penanda molekul dentin sialofosfat (DSPP) menunjukkan kedua-dua kertas ini mempunyai potensi penyerapan yang hampir serupa untuk kegunaan pengesanan molekul penanda pada GCF. Ujian sitotoksiti pula mendapati kedua-dua kertas tidak menunjukkan sebarang kesan toksik terhadap sel titisan MC3T3-E1, mengesahkan bahawa kertas ujian W595 sama seperti kertas kawalan Periopaper® bersifat bioserasi dan boleh digunakan dalam pensampelan melibatkan tisu manusia. Penggunaan kertas W595 menggantikan kertas kawalan Periopaper® dijangka dapat membantu dalam kajian pengesanan penanda biologi dan pemantauan penyakit periodontal pada pada kos yang lebih rendah dan lebih kerap.

RUJUKAN

- Ariffin, S.H.Z., Wong, W.Y., Zainol Abidin, I.Z., Wahab, R.M.A., Ariffin, Z.Z. & Senafi, S. 2014. Cytotoxicity effect of degraded and undegraded kappa and iota carrageenan in human intestine and liver cell lines. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 14: 508. <https://doi.org/10.1186/1472-6882-14-508>
- Arnida Hani Teh, Muhiyuddin Md Nasir, Saidatul Husni Saidin & Hafeedza Abdul Rahman. 2022. Jumlah fenol, aktiviti antioksidan dan toksisiti ekstrak bendalir lampau genting (SFE) buah *Ziziphus mauritiana*. *Sains Malaysiana* 51(7): 2329-2337.
- Balducci, L., Ramachandran, A., Hao, J., Narayanan, K., Evans, C. & George, A. 2007. Biological markers for evaluation of root resorption. *Archives of Oral Biology* 52(3): 203-208.
- Barros, S.P., Williams, R., Offenbacher, S. & Morelli, T. 2016. Gingival crevicular fluid as a source of biomarkers for periodontitis. *Periodontology* 2000 70(1): 53-64.
- Bibi, T., Khurshid, Z., Rehman, A., Imran, E., Srivastava, K.C. & Shrivastava, D. 2021. Gingival crevicular fluid (GCF): A diagnostic tool for the detection of periodontal health and diseases. *Molecules* 26(5): 1208. doi: 10.3390/MOLECULES26051208
- Bicchieri, M., Biocca, P., Colaizzi, P. & Pinzari, F. 2019. Microscopic observations of paper and parchment: The archaeology of small objects. *Heritage Science* 7: 47.
- Bostanci, N. & Belibasakis, G.N. 2018. Gingival crevicular fluid and its immune mediators in the proteomic era. *Periodontology* 2000 76(1): 68-84.
- Coronado-Castellote, L. & Jiménez-Soriano, Y. 2013. Clinical and microbiological diagnosis of oral candidiasis. *Journal of Clinical and Experimental Dentistry* 5(5): e279.
- Contreras, R.G., Vilchis, J.R., Sakagami, H., Nakamura, Y., Nakamura, Y., Hibino, Y., Nakajima, H. & Shimada, J. 2010. Type of cell death induced by seven metals in cultured mouse osteoblastic cells. *In vivo* 24(4): 507-512.
- Dalwai, F., Spratt, D.A. & Pratten, J. 2006. Modeling shifts in microbial populations associated with health or disease. *Applied and Environmental Microbiology* 72(5): 3678-3684.
- de Almeida-Junior, L.A., de Campos Chaves Lamarque, G., Herrera, H., Arnez, M.F.M., Lorencetti-Silva, F., Silva, R.A.B., Silva, L.A.B. & Paula-Silva, F.W.G. 2024. Analysis of the cytotoxicity and bioactivity of CeraSeal, BioRoot™ and AH Plus® sealers in pre-osteoblast lineage cells. *BMC Oral Health* 24(1): 262.
- Farah Amirah, M.N., Shahrul Hisham, Z.A., Saiful Anuar, K. & Rohaya, M.A.W. 2020. Label-free quantitative proteomic analysis of gingival crevicular fluid to identify potential early markers for root resorption. *BMC Oral Health* 20: 256.
- Farinawati, Y., Ng, W.C., Nur Atmaliya, L., Shahrul Hisham, Z.A. & Rohaya, M.A.W. 2022. Higher concentration of ascorbic acid as a sole induction factor for osteogenesis on MC3T3-E1 cell model. *Sains Malaysiana* 51(5): 1449-1464.
- Gupta, S., Gupta, R., Sinha, S., Sharma, E. & Mathur, A. 2022. Gingival crevicular fluid-An Eos of biomarkers. *Journal of Pharmaceutical Negative Results* 13(9): 825-833. doi: 10.47750/pnr.2022.13.s09.097
- Intan Zarina Zainol Abidin, Thanaleetchumi Manogaran & Shahrul Hisham Zainal Ariffin 2020. Cytotoxicity of L- and D-ascorbic acid on murine and human suspension peripheral blood cells. *Sains Malaysiana* 49(3): 593-602.
- Majeed, Z.N., Philip, K., Alabsi, A.M., Pushparajan, S. & Swaminathan, D. 2016. Identification of gingival crevicular fluid sampling, analytical methods, and oral biomarkers for the diagnosis and monitoring of periodontal diseases: A systematic review. *Disease Markers* 2016: 1804727.
- Mohd Norzaliman, M.Z., Zallhan, M.Y., Farinawati, Y., Asma, A., Wong, K.S.H., Lee, W.J., Tan, K.F., Shahrul Hisham, Z.A. & Rohaya, M.A.W. 2020. Absorption spectrum analysis of dentine sialophosphoprotein (DSPP) in orthodontic patient. *AIP Conference Proceedings* 2203(1): 020007.
- Monsen, R.E., Kristoffersen, A.K., Gay, C.L., Herlofson, B.B., Fjeld, K.G., Hove, L.H., Nordgarden, H., Tollisen, A., Lerdal, A. & Enersen, M. 2023. Identification and susceptibility testing of oral candidiasis in advanced cancer patients. *BMC Oral Health*. 23(1): 223. doi: 10.1186/s12903-023-02950-y
- Nassrawin, N.A. 2018. Detection of osteocalcin in gingival crevicular fluid in a group of orthodontic patients. *J. Int. Soc. Prev. Community Dent.* 8(2): 168-173. doi: 10.4103/jispcd.JISPCD_181_16
- Santamaria, P., Sari, A. & Nibali, L. 2023. Molecular profiling of gingival crevicular fluid fails to distinguish between infrabony and suprabony periodontal defects. *J. Clin. Periodontol.* 50(10): 1315-1325. doi: 10.1111/jcpe.13849
- Sharifah Nadhira Syed Annuar, Nurul Farahana Kamaludin, Normah Awang, Kok Meng Chan & Norraphat Uttraphan Pim. 2023. Diorganotin(IV) N-methyl-N-phenethyldithiocarbamate compounds induce cytotoxicity via apoptosis in K562 human erythroleukaemia cells. *Sains Malaysiana* 52(5): 1513-1521.
- Silva, F.G.A. & Gomes, S.C. 2009. Validation of an alternative absorbent paper for collecting gingival crevicular fluid. *Periodontia* 19(3): 85-90.
- Stockert, J.C., Horobin, R.W., Colombo, L.L. & Blázquez-Castro, A. 2018. Tetrazolium salts and formazan products in Cell Biology: Viability assessment, fluorescence imaging, and labeling perspectives. *Acta Histochemica* 120(3): 159-167. <https://doi.org/10.1016/j.acthis.2018.02.005>

- Subbarao, K.C., Nattuthurai, G.S., Sundararajan, S.K., Sujith, I., Joseph, J. & Syedshah, Y.P. 2019. Gingival crevicular fluid: An overview. *Journal of Pharmacy & Bioallied Sciences* 11(Suppl 2): S135-s139.
- Tarallo, F., Chimenti, C., Paiella, G., Cordaro, M. & Tepedino, M. 2019. Biomarkers in the gingival crevicular fluid used to detect root resorption in patients undergoing orthodontic treatment: A systematic review. *Orthodontics and Craniofacial Research* 22(4): 236-247.
- Uma, H. & Ahmed, N. 2018. Identification of dentine sialophosphoprotein in gingival crevicular fluid to assess root resorption using three piece base arch. *IOSR Journal of Dental and Medical Sciences* 17(01): 56-63.
- Vajrabhaya, L., Korsuwannawong, S. & Surarit, R. 2017. Cytotoxic and the proliferative effect of cuttlefish bone on MC3T3-E1 osteoblast cell line. *European Journal of Dentistry* 11(04): 503-507.
- Wahab, R.M.A., Abdullah, N., Ariffin, S.H.Z., Abdullah, C.A.C. & Yazid, F. 2020. Effects of the sintering process on nacre-derived hydroxyapatite scaffolds for bone engineering. *Molecules* 25(14): 3129. <https://doi.org/10.3390/molecules25143129>
- Wassall, R.R. & Preshaw, P.M. 2016. Clinical and technical considerations in the analysis of gingival crevicular fluid. *Periodontology 2000* 70(1): 65-79.
- Whatman. 2011. *Qualitative Filter Papers*. Whatman.
- *Pengarang untuk surat-menyurat; email: hisham@ukm.edu.my