

Viabilitas sel fibroblas BHK-21 pada permukaan resin akrilik rapid heat cured

(Viability of fibroblast BHK-21 cells to the surface of rapid heat cured acrylic resins)

Anita Yuliati

Bagian Ilmu Material dan Teknologi Kedokteran Gigi
Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga
Surabaya - Indonesia

ABSTRACT

Acrylic resins are widely used in the fabrication of denture bases and have been shown to be cytotoxic as a result of substances that leach from the resin. Numerous reports suggest that residual monomer may be responsible for mucosal irritation and sensitization of tissues. This information is important in addition to the information of the biological effect of such materials. The purpose of this study was to know the viability of fibroblast BHK-21 cells to the surface of rapid heat cured acrylic resins. The sample of 5 mm in diameter and 1 mm thickness was cured in water bath for 20, 30, and 40 minutes at 100° C. BHK-21 cells were grown in medium eagle to be 2×10^5 cell/ml in 96 well micro titer plates as the added sample and incubated at 37° C for 24 hour. Five hours before the end of the incubation MTT solution was added from step one to each well containing cells. Viability cells were measured by spectrophotometer at 550 nm. The data were statistically analyzed by using one-way analysis of variance followed by LSD test. The result indicated that viability of fibroblast BHK-21 cells did not decrease to the surface of resin acrylic rapid heat cured.

Key words: viability BHK-21 cells, rapid heat cured acrylic resins

Korespondensi (correspondence): Anita Yuliati, Bagian Ilmu Material dan Teknologi Kedokteran Gigi, Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga. Jln. Mayjen. Prof. Dr. Moestopo No. 47 Surabaya 60132.

PENDAHULUAN

Polimetil metakrilat yang merupakan material dasar dari resin akrilik di bidang kedokteran gigi digunakan sebagai material pembuatan basis gigi tiruan lepasan semenjak mulai diperkenalkan pada tahun 1937.¹ Material ini mempunyai beberapa keunggulan antara lain estetik yang baik, kekuatan tinggi, menyerap air rendah, daya larut rendah, mudah dilakukan reparasi, proses manipulasi mudah karena tidak memerlukan peralatan rumit.² Oleh karena itu resin akrilik masih menjadi pilihan utama dokter gigi sebagai pembuatan basis gigi tiruan lepasan, meskipun saat ini telah banyak digunakan material logam campur sebagai basis gigi tiruan lepasan.

Perkembangan material untuk pembuatan basis gigi tiruan telah dirasakan pada saat ini dengan dipasarkan resin akrilik jenis *rapid heat cured*. Pabrik pembuat material tersebut menyebutkan bahwa resin akrilik ini mempunyai *fitting* yang baik, komfortabel, *free bubble*, kuat, *cadmium-free*. Keunggulan jenis resin akrilik ini tidak memerlukan waktu yang lama untuk proses polimerisasi. Menggunakan perbandingan antara bubuk dan cairan resin akrilik yang tepat berdasarkan petunjuk pabrik dan jenis resin akrilik ini hanya memerlukan waktu selama 20 menit untuk proses polimerisasi. Hal ini berbeda dengan resin akrilik yang sebelumnya, memerlukan waktu sekitar 120 menit untuk proses polimerisasi.

Apabila proses polimerisasi dari resin akrilik berjalan singkat, akan menyebabkan kandungan monomer yang belum bereaksi menjadi polimer masih tetap tinggi.^{3,4} Hal ini telah terbukti bahwa resin akrilik jenis *rapid heat cured* bila proses polimerisasi selama 20 menit, kandungan monomer sisa yang terdeteksi dengan kromatografi gas sebesar 1,9%. Kandungan monomer sisa tersebut cukup tinggi bila dibandingkan dengan resin akrilik yang diproses dengan polimerisasi waktu yang lama.⁵ Kandungan monomer sisa dalam resin akrilik yang tinggi perlu mendapatkan perhatian. Bila material tersebut digunakan di dalam rongga mulut dapat mengakibatkan terjadi iritasi pada mukosa rongga mulut yang manifestasinya berupa kemerahan, rasa sakit dan pembengkakan.⁶ Peneliti lain juga melaporkan terjadi iritasi mukosa yang disebabkan pelepasan monomer sisa dari resin akrilik yang telah mengeras.⁷

Syarat material di bidang kedokteran gigi terutama yang digunakan di dalam mulut harus bersifat biokompatibel, artinya dapat diterima oleh inang, tidak toksik, tidak iritan, tidak bersifat karsinogenik dan tidak menimbulkan reaksi alergi.⁸ Kekurangan material resin akrilik adalah bersifat toksik.²

Metode kultur sel sering digunakan untuk pengujian efek biologi pada tingkat awal dari suatu material yang digunakan pada kedokteran gigi untuk mengetahui efek toksisitas.^{8,9} Sel *fibroblast BHK-21* adalah sel yang paling

banyak digunakan para peneliti untuk uji toksisitas material di bidang kedokteran gigi. Toksisitas dari material resin akrilik jenis *rapid heat cured* ini tidak dilaporkan oleh pabrik. Toksisitas material yang digunakan di kedokteran gigi berhubungan dengan viabilitas sel yang hidup. Pada penelitian ini viabilitas sel ditentukan dengan MTT *colorimetric bioassays* untuk mendeteksi secara kuantitatif sel hidup.¹⁰ Oleh karena itu perlu diteliti bagaimana viabilitas sel *fibroblast BHK-21* pada permukaan resin akrilik jenis *rapid heat cured* bila proses polimerisasi diperpanjang. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui viabilitas sel *fibroblas BHK-21* pada permukaan resin akrilik jenis *rapid heat cured* yang proses polimerisasinya diperpanjang. Manfaat penelitian ini dapat digunakan sebagai pertimbangan yang tepat dalam menentukan lama proses polimerisasi resin akrilik jenis *rapid heat cured* untuk menghasilkan material yang biokompatibel.

BAHAN DAN METODE

Jenis penelitian ini adalah eksperimental laboratoris. Bahan yang digunakan untuk penelitian adalah resin akrilik *rapid heat polymerized (Biocryl-2, Altripon Co. INC Box 3526 Paranaque, Philippines)*, gips keras (Moldano), sel *BHK-21* diperoleh dari stok (TDC Unair), MTT (Sigma Cat.No.M-5655), media *eagle's, bovine* serum albumin, fosfat bufer salin, lempeng kultur sel 96 sumuran beralas datar, larutan tripsin *versene*.

Alat yang digunakan adalah model master kuningan diameter 5 mm tebal 1 mm, kuvet logam, timbangan digital, termometer, pipet mikro, *laminar flow cabinet*, inkubator, spektrofotometer. Penelitian dilakukan di bagian Ilmu Material dan Teknologi Kedokteran Gigi Fakultas Kedokteran Gigi dan *Tropical Disease Center* Universitas Airlangga. Waktu penelitian Juli sampai Agustus 2003.

Pembuatan *mould* dilakukan dengan mengaduk gips keras dan air dengan perbandingan 100 gram gips dan 24 ml air (aturan pabrik) diaduk menggunakan spatel di atas vibrator. Adonan dimasukkan ke dalam kuvet yang telah disediakan di atas vibrator. Kemudian master kuningan diameter 5 mm dan tebal 1 mm diletakkan ditengah kuvet, gips dibiarkan sampai mengeras. Setelah gips mengeras, permukaan gips diulasi vaselin dan kuvet atas dipasang, selanjutnya adonan gips diisi di atas vibrator dan dipres, dibiarkan sampai gips mengeras. Selanjutnya kuvet dibuka, master model diambil sehingga diperoleh suatu cetakan (*mould*).

Pembuatan sampel dengan cara, *mould* yang diperoleh diulasi dengan bahan separator dan dibiarkan sampai kering. Kemudian mencampur resin akrilik jenis *rapid heat cured* dengan perbandingan 4 gram polimer: 2 ml monomer dalam mangkuk porselen. Setelah 5 menit adonan mencapai *dough stage*, adonan dimasukkan ke dalam *mould* sampai penuh dan ditutup dengan kertas selopan, selanjutnya kuvet lawan dipasang dan dipres dengan pres hidrolik bertekanan 50 kg/cm². Kemudian

kuvet dibuka kelebihan resin akrilik dipotong. Prosedur ini diulangi sampai tiga kali. Resin akrilik dibiarkan selama 15 menit (aturan pabrik). Selanjutnya, dilakukan penggodokan dalam air selama 20, 30 dan 40 menit pada suhu 100° C. Setelah itu kuvet diambil dari penggodokan dan dibiarkan sampai dingin pada suhu kamar. Selanjutnya sampel dikeluarkan dari kuvet, sisa gips yang menempel pada sampel akrilik dibersihkan.¹¹ Sampel yang didapat pada setiap kelompok dipotong dengan ukuran 5 × 5 mm. Jumlah sampel pada setiap kelompok perlakuan berjumlah 6 buah.

Kultur sel *BHK-21* dalam bentuk *cell-line* ditanam dalam botol. Setelah *confluent*, kultur dipanen dengan menggunakan larutan *trypsin versene*. Hasil panen diambil sedikit dan ditanam kembali dalam media *eagle* yang mengandung 10% bovine serum albumin diinkubasi selama 24 jam. Kemudian sel dipindahkan dalam botol kecil dan dibuat dengan kepadatan 2 × 10⁵ sel/ml, sel tersebut siap digunakan untuk pengujian sampel.

Pengujian viabilitas sel pada resin akrilik menggunakan lempeng kultur sel 96 sumuran beralas datar. Pengujian ini dilakukan sesuai standar *protocol* yang dianjurkan untuk esei MMT.¹² Pada setiap sumuran dimasukkan 200 µl media yang berisi sel dengan kepadatan 2 × 10⁵ sel/ml. Sebelum diuji sampel disterilkan terlebih dahulu dengan ultra violet selama 15 menit, selanjutnya sampel dimasukkan dalam lempeng sumuran. Pada penelitian ini pengujian dilakukan secara duplo. Kemudian lempeng sumuran diinkubasi selama 20 jam pada suhu 37° C. Setelah itu, pada setiap sumuran dimasukkan 20 µl MTT yang telah dilarutkan dalam PBS, diinkubasi kembali selama 5 jam suhu 37° C. Selanjutnya sampel diambil dari setiap sumuran, dan pada setiap sumuran ditambahkan 200 µl DMSO dan dipipet naik turun untuk melarutkan kristal yang terbentuk. Lempeng sumuran diinkubasi kembali selama 5 menit pada suhu 37° C. Selanjutnya, lempeng sumuran dibaca pada spektrofotometer dengan panjang gelombang 550 nm. Hasil yang diperoleh dinyatakan dalam *optical density* (absorben). Besar absorben setiap sumuran menunjukkan jumlah viabilitas sel dalam kultur media.^{13, 14}

HASIL

Hasil penelitian tentang viabilitas sel *fibroblast BHK-21* pada permukaan resin akrilik jenis *rapid heat cured* terlihat pada tabel 1.

Pada tabel 1 terlihat bahwa resin akrilik dengan penggodokan selama 40 menit paling tinggi rerata jumlah viabilitas selnya, sedangkan resin akrilik dengan penggodokan selama 20 menit paling rendah rerata viabilitas selnya. Data yang diperoleh homogen dan berdistribusi normal, diuji dengan *one sample Kolmogorov-Smirnov test*. Untuk mengetahui perbedaan viabilitas sel *fibroblast BHK-21* terhadap perlakuan resin akrilik *rapid heat cured* dilakukan perhitungan statistik

dengan menggunakan *ANOVA* satu arah, didapatkan nilai $p < 0,05$. Hasil analisis ini menunjukkan bahwa viabilitas sel *fibroblast BHK-21* pada permukaan resin akrilik *rapid heat cured* terdapat perbedaan yang bermakna. Untuk menentukan ada perbedaan antar perlakuan dilakukan uji *LSD*, seperti terlihat pada tabel 2.

Tabel 1. Rata-rata dan simpang baku viabilitas sel *fibroblast BHK-21* pada permukaan resin akrilik *rapid heat cured* (*optical density*)

Kelompok Perlakuan	Jumlah Sampel	Rata-rata \pm Simpang Baku
Kontrol positif	6	0,881 \pm 0,036
Penggodokan selama 20 menit	6	0,612 \pm 0,092
Penggodokan selama 30 menit	6	0,626 \pm 0,112
Penggodokan selama 40 menit	6	0,694 \pm 0,103

Pada tabel 2, terlihat viabilitas sel *fibroblast BHK-21* pada permukaan resin akrilik jenis *rapid heat cured* yang diperpanjang lama polimerisasinya dibandingkan kelompok kontrol positif (sel dan media tanpa sampel) ada perbedaan yang bermakna, berarti terjadi penurunan viabilitas sel *fibroblast BHK-21* pada permukaan resin akrilik jenis *rapid heat cured* dibandingkan kelompok kontrol. Bila polimerisasi resin akrilik jenis *rapid heat cured* diperpanjang 20, 30 dan 40 menit tidak ada perbedaan yang bermakna, berarti tidak terjadi penurunan viabilitas sel *fibroblast BHK-21* pada permukaan resin akrilik jenis *rapid heat cured*.

PEMBAHASAN

Basis gigi tiruan dari resin akrilik yang berpolimerisasi dengan sistem pemanasan dan kimia merupakan pilihan untuk pembuatan gigi tiruan lengkap dan sebagian lepasan. Dalam aplikasinya resin akrilik yang digunakan sebagai basis gigi tiruan akan kontak dan berada di dalam lingkungan rongga mulut, sehingga memerlukan penelitian tentang biokompatibilitas yang berhubungan dengan material tersebut.¹³ Uji viabilitas sel merupakan bagian dari uji

toksistas yang digunakan untuk mengevaluasi secara biologi efek suatu material kedokteran gigi yang diperlukan secara langsung terhadap jaringan dalam kultur sel untuk prosedur skrining standar yang direkomendasikan yang perhatian utama pada sifat iritasi lokal.⁸

Bila dilihat dari tabel 1, hasil ini sama dengan yang dilaporkan oleh peneliti sebelumnya, meskipun metode yang digunakan untuk mendeteksi viabilitas sel berbeda.¹¹ Penelitian ini menggunakan uji enzimatis untuk menentukan viabilitas sel atau toksistas suatu material dengan esei MTT {3-(4,5-dimethylthiazol-2yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide}. Esei ini banyak digunakan untuk mengukur proliferasi seluler secara kuantitatif atau untuk mengukur jumlah sel yang hidup. Keuntungan esei ini adalah pengukuran akurat dan sensitif karena menggunakan alat spektrofotometer yang dapat mendeteksi perubahan metabolisme sel secara jelas, manipulasi mudah, peralatan yang digunakan biasa tersedia di laboratorium, menghemat waktu, tenaga, tidak menggunakan isotop radioaktif.¹²

Resin akrilik diproses dengan penggodokan selama 20 menit paling rendah jumlah viabilitas selnya. Hal ini kemungkinan disebabkan pada pemanasan 20 menit masih tinggi kandungan monomer sisa yang ada dalam massa resin akrilik tersebut yang belum membentuk rantai polimer. Metode polimerisasi resin akrilik yang digunakan di kedokteran gigi ada beberapa cara, misal cara konvensional (penggodokan dalam air), radiasi gelombang mikro dan sinar tampak. Proses polimerisasi resin akrilik menggunakan cara konvensional sebaiknya penggodokan resin akrilik dalam air selama 90 menit pada suhu 70° C dilanjutkan 30 menit pada suhu 100° C.¹⁵ Bila proses polimerisasi dilakukan dalam waktu singkat dan suhu rendah, proses polimerisasi tidak berjalan sempurna, kandungan monomer sisa masih tinggi.³ Terjadinya monomer sisa dipengaruhi oleh perbandingan pencampuran antara bubuk dan cairan resin akrilik dari setiap jenis bahan dan prosedur prosesing resin akrilik.¹⁴ Hasil suatu penelitian, menyimpulkan kandungan monomer sisa dari resin akrilik jenis *rapid heat cured* paling tinggi pada penggodokan 20 menit dan paling rendah pada penggodokan selama 40 menit.⁵ Hal yang sama juga telah dilaporkan oleh peneliti lain, kandungan monomer sisa dari resin akrilik yang di proses selama 20 menit pada suhu 100° C paling tinggi dibandingkan yang diproses pada suhu tinggi dan waktu lama.¹⁴

Tabel 2. Uji *LSD* viabilitas sel *fibroblast BHK-21* pada permukaan resin akrilik *rapid heat cured*

Kelompok perlakuan	Kontrol positif	Penggodokan 20 menit	Penggodokan 30 menit	Penggodokan 40 menit
Kontrol positif	–	S	S	S
Penggodokan 20 menit		–	NS	NS
Penggodokan 30 menit			–	NS
Penggodokan 40 menit				–

Keterangan:

NS = tidak bermakna;

S = bermakna

Resin akrilik yang digodok selama 40 menit paling tinggi viabilitas sel dibandingkan dengan perlakuan yang lain. Hal ini kemungkinan disebabkan kandungan monomer sisa menurun. Kandungan monomer sisa resin akrilik akan menurun bila proses polimerisasi lama dan suhu penggodokan ditingkatkan.¹⁶

Viabilitas sel *fibroblast BHK-21* pada permukaan resin akrilik jenis *rapid heat cured* dari penelitian ini berbeda bermakna dibandingkan kelompok kontrol (tabel 2). Keadaan ini membuktikan bahwa viabilitas sel dipengaruhi oleh sesuatu komponen yang terlepas dari resin akrilik. Komponen yang terlepas tersebut kemungkinan adalah monomer metil metakrilat yang tidak bisa terpolimerisasi secara sempurna. Hal ini sesuai yang dikatakan oleh peneliti sebelumnya, bahwa proses polimerisasi tidak pernah berjalan sempurna. Tidak terpolimerisasinya monomer akan tertinggal dalam polimer sesudah proses kuring.¹⁷ Komponen dari resin akrilik misal: dimetakrilat, metil metakrilat, asam benzonat, dan *formaldehid* merupakan komponen toksik yang dapat terlepas dari resin komposit menyebabkan efek toksisitas.¹³

Metil metakrilat merupakan komponen utama monomer resin akrilik kemungkinan mempengaruhi viabilitas sel pada penelitian ini. Monomer metil metakrilat memperlihatkan tanda toksik pada monosit, granulosit dan sel endotel pada penelitian *in vitro* setelah diinkubasi satu menit pada dosis 10 mg mL⁻¹.¹⁸ Evaluasi dari berbagai merek dagang basis gigi tiruan, *eluates* dari resin akrilik mempunyai efek toksisitas terhadap sel epitel rongga mulut, gingival fibroblast manusia. Efek ini dapat menghambat pertumbuhan sel, replikasi DNA, sintesis RNA, dan proses metabolik sel.¹³

Evaluasi mikroskop pada uji MTT esei terlihat, sel gingival dan periodontal ligamen fibroblas yang terpapar *methyl methacrylate* (MMA), *isobutyl methacrylate* (IBMA) dan *1,6-hexanediol dimethacrylate* (1,6-HDMA) setelah inkubasi 24 jam memperlihatkan karakteristik morfologi sel menjadi tidak normal. Sel terlihat *pyknosis*, membulat, membengkak, batas membran sel tidak teratur dan kehilangan perlekatan pada lempeng mikrotiter. MTT esei dapat menentukan aktivitas dehidrogenase mitokondria sel yang digunakan sebagai indikator dari viabilitas sel.¹⁹

Bila ditinjau dari hubungan antara struktur monomer dan toksisitas dapat disimpulkan bahwa kelompok hidroksil dan metakrilat nampaknya akan meningkatkan toksisitas, dimetakrilat dengan 23 rantai *oxyethylene* memperlihatkan tingkat toksisitas yang tinggi daripada dimetakrilat dengan 14 rantai *oxyethylene*, efek toksisitas dari monomer berkorelasi dengan *logarithm* dari koefisien oktanol/air (log P).²⁰

Resin akrilik jenis *rapid heat cured* yang proses polimerisasi diperpanjang dari anjuran pabrik, viabilitas sel yang terdeteksi tidak ada perbedaan yang bermakna. Tidak terjadi penurunan viabilitas sel *fibroblast BHK 21* pada permukaan resin akrilik.

Toksisitas dapat dihubungkan dengan viabilitas sel yang merupakan faktor utama biokompatibilitas suatu material di kedokteran gigi yang secara umum ditentukan dengan uji sel kultur secara *in vitro*. Dibandingkan dengan penelitian secara *in vivo*, pada penelitian secara *in vitro* lebih mudah dikontrol, sistem parameter penilaian yang digunakan lebih sederhana, meminimalkan variabel *confounding*, dan penentuan mekanisme toksisitas lebih spesifik. Meskipun hasil penelitian secara *in vitro* secara kuantitatif tidak dapat dikorelasikan dengan hasil *in vivo*. Beberapa klinikus melaporkan ada toksisitas jaringan ketika jaringan tersebut terpapar komponen yang terlepas dari resin akrilik yang terpolimerisasi. Jaringan rongga mulut secara langsung akan kontak secara *in situ* oleh resin akrilik yang terpolimerisasi sehingga mendapatkan konsentrasi bahan kimia tertinggi. Hal ini akan berpengaruh terhadap kerusakan jaringan yang lebih besar.¹⁹ Oleh karena itu metode yang digunakan untuk mengurangi substansi yang terlepas dari basis gigi tiruan yang baru diproses sebelum digunakan dalam rongga mulut, sebaiknya gigi tiruan direndam dalam air paling sedikit satu hari atau direndam dalam air panas suhu 50° C.^{14, 21}

Hasil penelitian ini dapat disimpulkan tidak terjadi penurunan viabilitas sel *fibroblast BHK-21* pada resin akrilik jenis *rapid heat cured* bila lama polimerisasi diperpanjang dari 20 menit.

DAFTAR PUSTAKA

1. Craig RG, Powers JM. Restorative dental materials. 11st ed. St Louis, MO, Mosby; 2002. p. 636–89.
2. Parvizi A, Linquist T, Schneider R, Williamson D, Boyer D, Dawson DV. Comparison of the dimensional accuracy of injection-molded denture base materials to that of conventional pressure-pack acrylic resin. J Prostodont 2004; 13 (2): 83–9.
3. Combe EC. Notes on dental materials. 6th ed. New York: Churchill Livingstone; 1992. p. 158–60.
4. Harrison A, Huggett R. The effect of curing cycle on residual monomer level of acrylic resin denture base polymer. J Prosthet Dent 1992; 20: 370–74.
5. Intan Nirwana. Kandungan monomer sisa pada resin akrilik rapid heat cured dengan proses kuring berbeda. Majalah Kedokteran Gigi 2001; 34(3): 119–21.
6. Hensten, Petterson A, Yacobson N. Perceived side effect of biomaterials in prosthetic dentistry. J Prosthet Dent 1991; 65:138–44.
7. Taira M, Nakao H, Matsumoto T, Takahashi J. Cytotoxic effect of methyl methacrylate on 4 cultured fibroblasts. Int J Prostodont 2000; 13: 311–15.
8. Anussavice KJ. Phillips' science of dental materials. 11st ed. Elsevier Science (USA) Saunders; 2003. p. 172–94.
9. Schmalz G. The biocompatibility of non-amalgam dental filling materials. Eur J Oral Sci 1998; 106: 696–706.
10. Rose EC, Bumann J, Jonas IE, Kappert HF. Contribution to the biological assessment of orthodontic acrylic materials. Measurement of their residual monomer output and cytotoxicity. J Orofac Orthop 2000; 61(4): 246–57.
11. Intan Nirwana. Sitotoksitas resin akrilik rapid heat polymerized terhadap kultur sel BHK. Majalah Kedokteran Gigi 2004; 37(1): 15–8.

12. Dash P. Standard protocols MTT assay. 2002. Available <http://web.bham.ac.uk/can4psd4/brum/mtt.html>. Accessed 8/1/2002.
13. Sheridan PJ, Koka A, Ewoldsen NO, Lefebvre CA, Lavin MT. Cytotoxicity of denture base resins. *Int J Prosthodont* 1997; 10: 73–7.
14. Kedjarune U, Charoenworraluk N, Kootongkaew S. Release of methyl methacrylate from heat-cured and autopolymerized resins: Cytotoxicity testing related to residual monomer. *Australian Dental Journal*. 1999; 44: (1) 25–30.
15. De Clerck JP. Microwave polymerization of acrylic resin used in dental prostheses. *J Prosthet Dent* 1987; 57: 650–8.
16. Dogan A, Bek B, Cevik NN, Usanmaz A. The effect of preparation conditions of acrylic denture base materials on the level of residual monomer, mechanical properties and water absorption. *J Dent* 1995; 23: 313–8.
17. Kostoryz EL, Eick JD, Glaros AG, Judy BM, Welshons WV, Busmater S and Yourtee DM. Biocompatibility of hydroxylated metabolisms of BISGMA and BFDGE. *J Dent Res* 2003; 82: (5) 367–71.
18. Dahl OE, Garvik LJ, Lyberg T. Toxic effects of methylmethacrylate monomer on leukocytes and endothelial cells in vitro. *Acta Orthop Scan* 1994; 65: 147–53.
19. Lai Y, Chen YT, Lee Sy, Shienh TM, Hung SL. Cytotoxic effects of dental resin liquids on primary gingival fibroblasts and periodontal ligament cells in vitro. *J Oral Rehab* 2004; 31 (12): 1165–72.
20. Yoshi E. Cytotoxic effects of acrylates and methacrylates : relationships of monomer structures and cytotoxicity. *J Biomed Mater Res* 1997; 37: 517–24.
21. Tsuchiya H, Hoshino Y, Tajima K and Takagi N. Leaching and cytotoxicity of formaldehyde and methyl methacrylate from acrylic resin denture base materials. *J Prosthet Dent* 1994; 71(6): 618–24.