

## PERUBAHAN SINTESIS DNA HASIL INDUKSI METIL METAKRILAT PADA KULTUR JARINGAN

I G.A. Wahyu Ardani

Lab. Ortodonsia  
Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga

I.G.A. Wahyu Ardani: Perubahan Sintesis DNA Hasil Induksi Metil Metakrilat pada Kultur Jaringan. Jurnal Kedokteran Gigi Universitas Indonesia. 2003; 10 (Edisi Khusus): 504-509

### Abstract

Methyl methacrylate (MMA) is used widely for basic material in dental clinics. One of them is cold curing resins acrylic for orthodontics removable appliance. MMA is potentially to have the character to irritate and give an allergic reaction to oral mucous. Previous study showed that MMA have an effect on mitochondrial dehydrogenase epithelial cells by loosing its hydrogen and tight on this enzyme. The influence of cold curing resins acrylic on DNA synthesis of oral mucous epithelial is not known until at present. The purpose of this in-vitro study is to examine the DNA synthesis of fibroblast cells BHK-21 induced MMA. The result of this study is to increase the DNA synthesis from the cell culture induced MMA monomer at an incubation time of 12 and 18 hours. Toxicity of MMA was proved to increase DNA synthesis because DNA has a more sensitive effect as a toxic material may cause a deviation of oral mucous.

Key words: Methyl methacrylate; toxicity; DNA synthesis

### Pendahuluan

Metil metakrilat digunakan secara luas di bidang Kedokteran gigi, antara lain sebagai bahan dasar untuk pembuatan piranti ortodonsi lepasan resin akrilik *cold curing*. Proses polimerisasi resin akrilik *cold curing* ini tidak dapat terjadi secara sempurna untuk membentuk polimer, sehingga selalu meninggalkan monomer sisa.<sup>1,2</sup> Monomer sisa adalah monomer yang tidak bereaksi setelah polimerisasi selesai.<sup>2,3</sup>

Penelitian terdahulu telah dibuktikan kandungan monomer sisa ini sebesar 5,27% (B/B).<sup>7</sup> Salah satu penyebab jejas sel adalah agen kimia.<sup>7</sup> Telah dibuktikan pula secara *in vitro* bahwa

dengan meningkatnya kadar dan lama paparan monomer MMA makin menurunkan aktivitas enzim mitokondrial dehidrogenase (enzim MD) dari epitel mukosa rongga mulut.<sup>6</sup> Mitokondria adalah *power houses*, dimana sintesis ATP hampir 90% dibentuk di sini. Jadi dengan adanya penurunan aktivitas enzim MD lebih lanjut dapat menurunkan sintesis ATP. Penurunan sintesis adenosin trifosfat (ATP) untuk selanjutnya dapat menyebabkan bermacam-macam efek antara lain dapat menurunkan sintesis protein.<sup>5,7,8</sup>

Tujuan penelitian ini untuk membuktikan adanya gangguan sintesis DNA yang ditunjukkan dengan adanya nilai *optical density DNA* pada kultur sel BHK-21 hasil induksi MMA.

Hasil penelitian ini diharapkan dapat mengungkap patogenesis suatu kelainan di rongga mulut; dengan demikian dapat memberikan kepastian bahwa keamanan bahan resin akrilik *cold curing* tersebut kurang memberikan keamanan untuk dipakai di dalam rongga mulut, terutama di bidang Kedokteran Gigi khususnya bidang ortodonsia

### Bahan dan Cara Penelitian

Bahan-bahan yang diperlukan dalam penelitian ini: *cell line* BHK-21 clone 21 (fibroblast sel ginjal dari baby hamster). Media kultur : *Minimum Essential Medium*, *bovine serum*, 100u/ml penisilin, dan 10µg/ml streptomisin; Phosphat Buffer Saline (PBS) t.d.:  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , NaCl, dan  $\text{Na}_2\text{PO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ ; Aquadest; *Chelex*. Monomer MMA murni dari Merck.

Kultur sel BHK-21 sebanyak 50000 sel dimasukkan dalam 200µl MEM baru. Untuk perlakuan diperlukan monomer MMA (0, 10, 30, 50)µg/ml. Setiap perlakuan dilakukan replikasi banyak tujuh kali. Setelah dilakukan paparan monomer MMA, sesuai dengan kadar yang telah ditentukan dan lama inkubasi 12 jam dan 18 jam, diukur densitas optik pada panjang gelombang 260nm.

Setelah diinkubasi 12 dan 18 jam, suspensi sel ditambahkan PBS 500µl kemudian diputar dengan kecepatan 5000rpm selama 1 menit. Pelet sel dicuci kembali dengan PBS 500µl (kecepatan 5000rpm selama 1 menit). Pellet sel diambil ditambahkan *Chelex*, kemudian direbus 95°C selama 10 menit untuk memberikan kesempatan DNA terlepas dari *chelex*. Kemudian divortex sebentar. Supernatan diambil (DNA-nya) dan diencerkan sebanyak 50 kali (784µl aquadest ditambah 16µl DNA). Nilai OD (*optical density*) DNA diukur dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 260nm. Pada OD tersebut dan pengenceran supernatan (ekstraksi DNA-nya) sebesar 50 kali diperoleh nilai absorpsi 0,198; maka akan diperoleh konsentrasi DNA sebesar  $0,198 \times 50000$  (ng/µl) = 495ng/µl.

Penelitian dilakukan di Tropical Disease Centre, Universitas Airlangga.

### Hasil dan Diskusi

Kontak antara piranti ortodonsi lepasan dengan mukosa mulut mencakup area yang cukup luas. Secara klinis hal tersebut dapat menyebabkan mukosa tersebut terinflamasi, terinfeksi atau terkena trauma. Paparan bahan yang dapat merusak mukosa, baik paparan akut maupun paparan kronis, bisa membahayakan kesehatan mukosa rongga mulut penderita.<sup>1,9,10,11</sup> Efek ini diperkirakan disebabkan oleh produk toksik baru yang timbul saat polimerisasi atau produk toksik sisa dari reaksi polimerisasi yang tidak sempurna.<sup>1,12</sup> Ternyata eluat polimer resin akrilik *cold curing* mengandung bahan yang potensial toksik antara lain adalah formaldehid, metil metakrilat, asam metakrilat.<sup>9,12,13</sup> Sitotoksitas resin dipostulasikan sebagai reaksi dari produk atau komponen yang tidak bereaksi (tidak terpolimerisasi), yang dilepaskan oleh suatu bahan.<sup>12</sup> Metil metakrilat resin akrilik dari *light polymerized* telah dibuktikan dapat menghambat replikasi sel epitel mukosa rongga mulut, dimana sintesis DNA lebih sensitif terhadap efek toksik bahan yang dapat berkaitan dengan penyebab terjadinya kelainan patologi rongga mulut.<sup>5,14</sup>

Uji *in vitro* dapat dilakukan cukup baik dengan cara menggunakan kontrol, baik terhadap variabel-variabel individual sehingga mampu menentukan mekanisme toksik yang lebih baik. Namun pada uji ini harus dipertimbangkan pula adanya kelemahan-kelemahan, seperti mekanisme penghambat/pereda seperti aliran saliva dan kapasitas bufer tidak dapat dilakukan.<sup>15</sup> Kultur sel yang digunakan untuk penelitian ini dipakai kultur sel fibroblas dari ginjal hamster (BHK-21). Kultur sel BHK-21 digunakan sebagai model uji sitotoksitas dari MMA. Kultur sel tersebut selain mudah didapat juga mudah untuk penanganannya dan tidak terlalu memerlukan biaya perawatan yang tinggi.<sup>15</sup>

Dipilih *celex* untuk ekstraksi DNA untuk menentukan nilai *optical density* (OD) DNA adalah *celex* (Promega), karena mempunyai beberapa kelebihan seperti mudah pengerjaannya karena tidak memerlukan tahapan yang terlalu panjang (praktis), mempunyai ketepatan tinggi disamping itu murah biayanya. OD adalah suatu intensitas pewarnaan pada panjang gelombang tertentu, artinya dengan OD yang dapat ditangkap oleh spektrofotometer. Ini menunjukkan bahwa derajat asosiasi pewarnaan tersebut terhadap *sequence* asam amino dari DNA.<sup>7,16</sup> Jadi apabila OD DNA makin tinggi, maka makin banyak DNA yang disintesa. Hingga saat ini belum diketahui bagaimana pengaruh MMA terhadap sintesis DNA yang diukur melalui nilai OD DNA kultur sel yang diinduksi dengan MMA. Nilai rerata dan Simpangan Baku sebagai hasil dari ekstraksi DNA yang ditunjukkan dengan nilai OD DNA dapat dilihat pada tabel 1.

Tabel 1 : Rerata dan Simpangan Baku untuk paparan (0, 10, 30, 50)µg/ml MMA selama 12 jam

Kadar (µg/ml)	Rerata	SB	Min	Maks
0	63,75	12,37	55,0	72,5
10	119,17	7,22	115,0	275,0
30	104,17	22,55	82,0	127,5
50	57,50	44,23	117,0	205,0

Keterangan : SB = Simpangan Baku; Min = minimal, Maks = maksimal

Simpangan Baku pada tabel diatas makin besar dengan meningkatnya kadar paparan MMA. Nilai-nilai minimal dan maksimal mempunyai nilai yang tumpang tindih diantara kadar paparan (10, 30, 50)µg/ml MMA. Ini menunjukkan bahwa ada kecenderungan OD DNA makin meningkat.

Setelah dilakukan pengukuran OD DNA, kemudian dilakukan analisis varians satu arah, diketahui bahwa ada perbedaan bermakna diantara kadar paparan (0, 10, 30, 50) µg/ml MMA pada lama paparan 12 jam (tabel 2).

Tabel 2. Analisis varians satu arah pada paparan (0, 10, 30, 50) µg/ml MMA selama 12 jam

	D.F	SUM OF SQUARE	MEAN OF SQUARE	F RATIO	F PROB
Antar Kelompok	3	11073,7689	3691,2553	4,98	0,037
Diantara Kelompok	7	5186,4583	740,9225		
TOTAL	10	16260			

Keterangan : db = derajat bebas; uji anova dua arah bermakna bila  $p < 0,05$ ; F = F hitung; F prob = sig F = p = probabilitas  $P < \alpha = 0,005$  : bermakna

Tabel 3: Uji komparasi ganda SNK masing-masing paparan (0, 10, 30, 50) µg/ml MMA pada paparan 12 jam

Kadar (µg/ml)	10µg/ml	30 µg/ml	50µg/ml
0	55,42	40,42	93,75*
10	-----	15,50	38,33
30		-----	53,33
50			-----

Keterangan : Tanda bintang menunjukkan adanya perbedaan bermakna.

Untuk masing-masing paparan dibedakan dengan analisis varians. bermakna bila F prob lebih kecil dari pada  $\alpha$ . Pada tabel 2 p (0.04) lebih kecil dari  $\alpha$  (0.05). menunjukkan adanya perbedaan bermakna. Untuk melihat mana yang menunjukkan perbedaan bermakna diantara masing-masing kadar MMA. dilakukan uji kemaknaan dengan *Student-Newman-Keuls* (SNK).

Sedangkan untuk kadar paparan (0, 10, 30, 50)  $\mu\text{g/ml}$  MMA pada waktu 18 jam mempunyai rerata dan Simpangan Baku OD DNA yang dapat dilihat pada tabel 4.

Nilai-nilai minimal dan maksimal mempunyai nilai yang kurang tumpang tindih diantara kadar paparan (10, 30, 50)  $\mu\text{g/ml}$  MMA. Ini menunjukkan bahwa makin tinggi paparan MMA makin OD DNA makin meningkat dan menunjukkan ada perbedaan.

Hasil pengukuran dengan analisis varians satu arah dari OD DNA pada kadar paparan (0, 10, 30, 50)  $\mu\text{g/ml}$  MMA diketahui bahwa ada perbedaan bermakna pada lama paparan 18 jam.

Tabel 4 : Rata-rata dan Simpangan Baku untuk paparan (0, 10, 30, 50)  $\mu\text{g/ml}$  MMA selama 18 jam

Kadar ( $\mu\text{g/ml}$ )	Rerata	SB	Min	Maks
0	57,50	10,61	50,00	65,00
10	104,17	12,33	90,00	112,00
30	120,00	28,17	102,00	152,00
50	131,67	18,43	117,00	152,00

Keterangan : SB = Simpangan Baku; Min = minimal; Maks = maksimal

Tabel 5 : Analisis varians satu arah pada paparan (0, 10, 30, 50)  $\mu\text{g/ml}$  MMA selama 18 jam

	D.F	SUM OF SQUARE	MEAN OF SQUARE	F RATIO	F PROB
ANTAR KELOMPOK	3	7254,1667	2418,0556	5,3080	0,0212
DIANTARA KELOMPOK	7	2683,3333	383,3333		
TOTAL	10	16260			

Keterangan : db = derajat bebas; uji anova dua arah bermakna bila  $p < 0,05$ ; F = F hitung; F prob = sig F = p = probabilitas  $P < \alpha = 0,05$  : bermakna

Tabel 6 : Uji kemaknaan masing-masing paparan (0, 10, 30, 50)  $\mu\text{g/ml}$  MMA pada paparan 18 jam

Kadar	10 $\mu\text{g/ml}$	30 $\mu\text{g/ml}$	50 $\mu\text{g/ml}$
0	46,67	62,5	74,17*
10	-----	15,83	27,5*
30		-----	11,67*
50			-----

Keterangan : Tanda bintang menunjukkan adanya perbedaan bermakna

Masing-masing paparan pada waktu inkubasi 18 jam setelah dilakukan analisis varians, menunjukkan adanya perbedaan bermakna karena  $p$  (0,02) lebih kecil dari  $\alpha$  (0,05). Kemudian dilanjutkan dengan uji kemaknaan dengan menggunakan SNK (Tabel 6.).

Proses mitosis atau multiplikasi dari sel tergantung dari gen yang mengatur dalam proses mitosis. Sel dapat tumbuh tidak normal (berlebihan) maka akan terjadi proses multiplikasi yang berlebihan juga oleh karena tidak ada inhibisi kontak lagi. Beberapa induktor yang dapat menginduksi fosforilasi pada tahap transkripsi DNA adalah: sinar ultraviolet, faktor pertumbuhan, cAMP, ion kalsium, phorbol ester, dan garam logam berat, dan panas (*hitshock*).<sup>17,18</sup>

Pengaktifan gen melalui fosforilasi dapat mempengaruhi fungsi dari urutan nukleotida promotor. Gen yang meregulasi terjadinya fosforilasi/proliferasi pada hewan ditentukan oleh *c-Fos-Gen* yang mengandung TATA BOX yang merupakan signal awal dari terjadinya transkripsi.<sup>17,18</sup>

Dari hasil analisis keseluruhan dengan menggunakan anova diperoleh kesimpulan bahwa berbagai kadar paparan MMA pada waktu paparan 12 dan 18 jam berpengaruh terhadap OD DNA dari kultur sel yaitu meningkatkan sintesis DNA. Dibandingkan dengan penelitian terdahulu MMA justru menghambat proliferasi kultur sel pada sel epitel *HeLa clone 12*, melalui penghambatan pada mitokondria sebagai *power houses*. Kemungkinan yang paling mungkin terjadi dari penelitian ini adalah pengaruh MMA terhadap fosforilasi, dimana merupakan tahapan penting dimana gen yang mengatur untuk awal terjadinya transkripsi. Dengan demikian sintesis DNA justru akan terpicu pada kultur sel BHK-21. Sedang pada kultu sel HeLa (sel epitel) justru menghambat proliferasi sel. Peningkatan sintesis DNA oleh karena induksi MMA akan menyebabkan sintesis protein yang berlebihan, sehingga akhirnya dapat menyebabkan keadanan patologis yang sangat merugikan seperti kanker atau respons tubuh yang berlebihan.<sup>19</sup>

Hasil keseluruhan penelitian ini menunjukkan bahwa pengaruh sitotoksisitas monomer MMA pada kultur sel fibroblast BHK-21 dapat meningkatkan sintesis DNA kultur sel BHK-21, hal ini ditunjukkan adanya peningkatan nilai OD DNA. Peningkatan sintesis DNA mungkin disebabkan oleh induksi monomer MMA terhadap gen pengendali *C-Fos-Gen* sehingga terjadi fosforilasi. Dan diharapkan dilakukan penelitian lebih lanjut bagaimana MMA dapat menginduksi gen pengendali *C-Fos-Gen* sehingga fosforilasi dapat terjadi.

### Daftar Pustaka

1. Baker S, Brooks SC, and Walker DM. 1988. The Release Of Residual Monomeric Methyl Methacrylate From Acrylic Appliance In Human Mouth: An Assay For Monomer In Saliva. *J Dent Res* 67 : 1295-1299.
2. Anusavice KJ. 1996. Phillip's Science Of Dental Material. 6<sup>th</sup> ed. Philadelphia : WB Saunders Co. pp 75-80 and 250 -252.
3. Combe EC. 1992. *Notes And Dental Material*. 6<sup>th</sup> ed. Edinburg London New York : Churchill Livingstone. pp 26-31.
4. Ardani W IGA. 2001. Kadar Monomer Sisa Akrilik Jenis *Cold Curing* Tanpa Dan Dengan Polyklaf (Dentaurum) Pada Tekanan 2 Atmosfir. *Maj. Ortod*. Vol. 1, No.2. Surabaya (2) : 29-32.
5. Kumar V, Cotran R, and Robbins S. 1997. *Basic Pathology*. 6<sup>th</sup> edition. Canada - Toronto WB Saunders Co. pp 47-59.
6. Ardani W IGA. 2001. *Penurunan Aktivitas Enzim Mitokondrial Dehidrogenase Dari Epitel Mukosa Rongga Mulut Karena Pengaruh Monomer Sisa Resin Akrilik Cold Curing*. Temu Ilmiah Nasional Kedokteran Gigi ke II (TIMNAS). Surabaya.
7. Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, and Watson JD. 1994. *Moleculr Biology Of The Cell*, 3<sup>rd</sup> ed. New York-London Garland Publishing Inc. pp 155-253.
8. Goldsby RA; Kindt TJ; Osborne BA. 2000. Kuby. *Immunology*. 4<sup>th</sup> ed. WH Freeman & Co. New York.
9. Lefebvre CA, Schuster GS, Richardson DW, and Barron DJ. 1992. The Cytotoxic Effects Of Denture Base Resin Sealants. *Int J Prosthodont* 5 : 558-562.

- Effects Of Denture Base Resin Sealants. *Int J Prosthodont* 5 : 558-562.
10. Zentner MA, Sergl HG, and Kretschmer A. 1994. *An In-vitro Study Of Resins Used In Orthodontics For Their Cell Toxicity*. *Fortschr-Kieferorthop* 55 : 311-318.
  11. Kedjarune U, Charoenworakul N, and Koontongkaew S. 1999. Release Of Methacrylate From Heat-Cured And Autopolymerized Resins : Cytotoxicity Testing To Residual Monomer. *Aust Dent J* 44 : 25-30.
  12. Lefebvre CA, Knoerschild KL, and Schuster GS. 1994. Cytotoxicity Of Eluates From Light-polymerized Denture Base Resins. *J Prosthodont* 72 : 644-650.
  13. Lefebvre CA, Schuster GS, Caughman GB, and Caughman WF. 1991. Effects Of Denture Base Resin On Oral Epithelial Cells. *Int J Prosthodont* 4 : 371-376.
  14. Barron DJ, Schuster GS, Caughman GB, and Lefebvre CA. 1993. Biocompatibility Of Visible Light-polymerized Denture Base Resins. *Int J Prosthodont* 6 : 495-501.
  15. Freshney RI. 1994. *Culture Of Animal Cells*, 3<sup>rd</sup> ed. New York : Wiley-Liss, pp 133-135.
  16. Lehninger AL, Nelson DL, and Cox MM. 1993. *Principles Of Biochemistry*, 2<sup>nd</sup> ed. New York : Worth Publishers, pp 543-593.
  17. Knippers R. 1997. *Molekulare Genetik*. Stuttgart : Georg Thieme Verlag . Pp 329-378.
  18. Kulozik AE, Hentze MW, Hagemeyer C, and Bartram CR. 2000. *Molekulare Medizin*. Berlin : Walter de Gruyter, pp 49-62.
  19. Asabe S, Tanji Y, Satoh S, Kaneko T, Kimura K. 1997. The N-Terminal Region of Hepatitis C Virus-Encoded NS5A Is Important for NS4A-Dependent Phosphorylation. *J Virol* 71 : 790-796.