

UJI SITOKTOKSISITAS BAHAN CYANOACRYLATE VENEER DENGAN MTT ASSAY

Elly Munadzirah

Bagian Ilmu Material dan Kedokteran Gigi, Fakultas Kedokteran Gigi, Universitas Airlangga

Elly Munadzirah. Uji sitotoksitas bahan cyanoacrylate veneer dengan MTT assay. Indonesian Journal of Dentistry 2004; 11(2): 66-70.

Abstract

The use of acrylic resin restoration based on methyl methacrylate material in the dentistry, has already been replaced by composite because of certain poor characteristics. Recently, the restoration materials of methyl methacrylate have been re-developed, and made commercially available with cyanoacrylates added. The objective of this study was to investigate the cytotoxic effects of cyanoacrylate veneer materials by 3-(3,4-dimethylthiazol-2yl)-2,5-diphenyl retrazolium biomide (MTT) assay methods. Cyanoacrylate veneer specimens were immersed in eppendorf microtubes with cell culture media for 1, 12, 24 or 48 hour. Culture media were immersed and used to investigate the cytotoxic effect to BHK 21 cell lines by MTT assay method. The density of optic formazan was live indicate a cell. All data were statistically analyzed by one-way ANOVA and HSD Tukey. The results show that the cytotoxic effects between the five immersion were similar but higher than control cell. In conclusion Immersion in cyanoacrylate veneer has a cytotoxic effect to BHK 21 cell lines. The lowest percentage of cells a live after immersion was 86,95 %.

Key word : reservation materials, cytotoxic effects, formazan optical density.

Pendahuluan

Pemakaian bahan restorasi gigi jenis *polymethyl methacrylate* di bidang Kedokteran Gigi telah ditinggalkan karena mempunyai banyak kekurangan di antaranya, efek monomer sisa, dan terjadinya penyusutan yang besar oleh karena proses polimerisasi.¹ Dikatakan pula bahwa *methyl methacrylate* dapat mengiritasi pulpa dengan cara berdifusi

melalui tubuli dentin. Saat ini bahan *polymethyl methacrylate* dikembangkan kembali dan diperdagangkan secara luas. Bahan *polimethyl methacrylate* tersebut ditambahi suatu bahan *cyanoacrylate* sehingga mempunyai beberapa keuntungan antara lain bersifat kompatibel terhadap pulpa, perlekatan yang baik, kompatibel secara histologis, estetik yang bagus, *processing* yang cepat, penggunaan sangat

bervariasi, bebas monomer sisa, tidak menyebabkan alergi.²

Masih terdapat perbedaan pendapat tentang penggunaan bahan *cyanoacrylate*, antara lain pernyataan American Dental Association^{3,4} yang mengatakan bahwa *cyanoacrylate* adalah salah satu tipe semen polimer yang penggunaannya terbatas, karena dapat menyebabkan iritasi lokal, di samping itu bahan tersebut mudah mengalami hidrolisis. Jenis

cyanoacrylate yang dipakai adalah jenis *methyl cyanoacrylate*. Berdasarkan alasan tersebut, ADA tidak merekomendasikan bahan tersebut untuk diperdagangkan. Bahan *methyl cyanoacrylate* menyebabkan kerusakan pada jaringan tulang.⁵

Bahan restorasi *cyanoacrylate veneer* mengandung *ethyl 2 cyanoacrylate* yang merupakan keluarga *alkyl cyanoacrylate*, sehingga dikhawatirkan dapat menyebabkan toksik pada jaringan mengingat penggunaan restorasi dapat menyebabkan kontak dengan *gingiva*. Salah satu pengujian untuk menentukan berbagai sifat dari suatu bahan adalah uji toksisitas terhadap jaringan.⁶ Uji sitotoksitas adalah bagian dari evaluasi bahan kedokteran gigi dan diperlukan untuk prosedur *screening standart*. Tujuan uji ini untuk mengetahui efek toksik suatu bahan secara langsung terhadap kultur sel. Kultur *cell lines* mempunyai keuntungan, yaitu pasase dapat dilakukan lebih dari 50-70 kali, kecepatan pertumbuhan sel tinggi, integritas sel tetap terjaga, dan sel mampu bermultiplikasi dalam suspensi. *Cell lines* telah banyak digunakan untuk menguji toksisitas bahan-bahan dan obat-obatan di bidang kedokteran gigi, antara lain dengan sel *BHK-21* yang berasal dari fibroblas ginjal bayi hamster. Salah satu metode untuk menilai sitotoksitas suatu bahan adalah dengan *MTT assay*.⁷

MTT assay didasarkan pada kemampuan sel hidup untuk mereduksi garam *MTT*. Prinsip *assay* ini adalah pemecahan cincin *tetrazolium MTT* dengan adanya dehidrogenase pada mitokondria yang aktif, menghasilkan produk formazan biru keunguan yang tidak larut.⁸ Keunggulan uji *MTT assay* adalah sensitif, cepat, semi otomatis, dan tidak menggunakan radioisotope.⁷

Bahan yang digunakan dalam bidang kedokteran gigi seharusnya tidak toksik, tidak mengiritasi, dan harus mempunyai sifat bioadaptasi. Hal ini sesuai dengan pendapat Noort⁹ yang menyatakan bahwa bahan yang diproduksi tidak boleh mempunyai efek yang merugikan terhadap lingkungan biologis, baik lokal maupun sistemik. Suatu bahan baru yaitu *cyanoacrylate veneer* mengandung *ethyl 2 cyanoacrylate* yang diduga bersifat toksik.

Berdasarkan hal tersebut maka timbul permasalahan apakah perendaman bahan *cyanoacrylate veneer* dalam media kultur sel selama 1, 12, 24, dan 48 jam mempunyai efek sitotoksitas terhadap *cell line BHK 21* dengan metode *MTT Assay*. Tujuan penelitian ini adalah untuk membuktikan sitotoksitas bahan *cyanoacrylate veneer* setelah dilakukan perendaman dalam media kultur sel selama 1, 12, 24, dan 48 jam dengan metode *MTT Assay*.

Bahan dan Cara Kerja

Jenis penelitian eksperimental laboratoris, rancangan penelitian *Post test only controle group*. Subyek penelitian lempeng *Cyanoacrylate Veneer* berbentuk bulat dengan diameter 5 mm, tebal 2 mm.¹⁰ Lokasi penelitian Laboratorium Imunokimia Bioteknologi Pusat Antar Universitas, Universitas Gajah Mada Yogyakarta.

Cara penelitian adalah sebagai berikut. Cetakan sampel difiksasi dengan plat kuningan, daerah kerja dibersihkan dengan alkohol kemudian dikeringkan, cairan *fast* diulaskan selapis tipis menggunakan kuas. Bubuk dicampur dengan *fast* dengan perbandingan 30 mg : 22,5 mg

untuk pembuatan 5 spesimen. Bahan *cyanoacrylate veneer* dengan perbandingan bubuk dan liquid 1 : 0,75 diaduk, setelah tercampur diaplikasikan ke dalam cetakan sampel dengan *plastic filling instrument* lalu diberi setetes *accelator quick*. Bagian atas cetakan diberi *matriks strip*, ditekan dengan plat kuningan yang diberi beban seberat 500 gr selama 30 detik, kemudian beban dan plat diambil, pada bahan *cyanoacrylate* tersebut diulas cairan *quick*, selanjutnya diulas 1 lapis *fast*. Setelah sampel mengeras, dilepas dari cetakan, sehingga diperoleh sampel berbentuk silindris. Sampel harus memenuhi kriteria tidak porus dan permukaan sampel rata.

Sampel berbentuk silindris dengan ukuran diameter dalam 5 mm dan tinggi 2 mm dimasukkan ke dalam 200 μ l media kultur dalam *ependorf*, didiamkan pada suhu ruang, sesuai dengan kelompok sampel yaitu selama 1, 12, 24, 48 jam. Setelah waktu perendaman dicapai, sampel diambil, bahan perendam dilakukan sterilisasi dengan filter ukuran 0,2 μ m.¹¹ Hasil filter ditampung dalam *ependorf* sebanyak 50 μ l. Hasil filter tersebut digunakan untuk uji sitotoksitas.¹²

Sebelum dilakukan uji sitotoksitas, dipersiapkan kultur sel *BHK-21* sesuai dengan petunjuk pada laboratorium Biotek-PAU. Uji sitotoksitas adalah sebagai berikut. Dipersiapkan *microplate* dengan 96 well (sumuran), kedalam masing-masing well dimasukkan sel dengan kepadatan 2×10^5 dalam 100 μ l media kultur *Rosewell Park Memorial Institute-1640* (RPMI-1640 89%, penstrep 1%, *Foetal Bovine Serum/ FBS* 10%, *Fungizone* 100 unit/ml). Tambahkan media bekas peren-

Uji sitotoksisitas bahan cyanoacrylate veneer dengan MTT assay

daman *cyanoacrylate* yang telah di filter ke dalam tiap sumuran, dari perendaman 1, 12, 24 dan 48 jam sebanyak 50 µl. Disiapkan pula kontrol sel dan kontrol media dilakukan pengulangan 7 kali. Sebagai kontrol digunakan sel ditambah media serta media tanpa sel. Masing-masing dilakukan 10 kali pengulangan. Diinkubasi 24 jam pada suhu 37° C. Ditambahkan 25 µl pereaksi MTT 5mg/ml dalam media untuk setiap sumuran, 4 jam sebelum masa inkubasi berakhir, diinkubasi kembali dalam inkubator 37°C selama 4 jam. Setelah inkubasi selesai tambahkan larutan *sodium dodecyl sulphate (SDS)* 10% sebanyak 80 µl tiap sumuran. Diputar 30 rpm selama 5 menit. Nilai densitas optik dihitung dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 570 nm.

Data yang diperoleh ditabulasi, kemudian dilakukan analisis statistik menggunakan *One-Way Anova* satu arah dan dilanjutkan dengan uji *Tukey High Significant Defference (HSD)*.

Hasil Penelitian

Nilai densitas optik formazan bahan *cyanoacrylate veneer* diukur dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 570 nm dapat dilihat pada Tabel 1.

Dari Tabel 1 tampak bahwa masing-masing bahan *cyanoacrylate veneer* menunjukkan nilai densitas optik menurun dibandingkan kontrol. Probabilitas normalitas pada *Kolmogorov-Smirnov Test* menunjukkan seluruh kelompok mempunyai nilai probabilitas lebih besar dari 0,05 ($p > 0,05$), artinya seluruh kelompok berdistribusi normal, kemudian dilakukan uji parametrik

Tabel 1. Nilai rerata, simpang baku, prosentasi dan probabilitas normalitas densitas optik formazan pada bahan *cyano acrylate veneer*

	Nilai Densitas Optik		SD	pn	N
	X	%			
Kontrol media	0,08286	100,000	0,00134	0,986	7
Kontrol sel	0,26414	100,000	0,00285	0,954	7
1 jam	0,21971	87,1943	0,00349	0,903	7
12 jam	0,22000	87,1782	0,00300	0,982	7
24 jam	0,21957	87,1541	0,00310	0,992	7
48 jam	0,20419	86,9509	0,00227	0,713	7

Keterangan: X = Rerata nilai densitas optik SD = Simpang baku
Pn = Probabilitas normalitas N = Jumlah sampel
% = Rerata prosentase densitas optik formazan

Tabel 2. Hasil uji *one way ANOVA* densitas optik formazan pada bahan *cyanoacrylate veneer*

Sumber variasi	Jumlah kuadrat	Db	Rerata kuadrat	F	p
Antar kelompok	0,135	5	2,696E-02	3520,447	0,000
Dalam kelompok	2,757E-04	36	7,659E-06		
Total	0,135	41			

Keterangan: db = derajat bebas F = F hitung p = Probabilitas

Tabel 3. Uji *Tukey HSD* densitas optik formazan antar masing-masing perlakuan

Kelompok	48 jam	24 jam	12 jam	1 jam
Kontrol Media	B	B	B	B
Kontrol sel	B	B	B	B
1 jam	TB	TB	TB	-
12 jam	TB	TB	-	-
24 jam	TB	-	-	-

Keterangan: B = Bermakna; TB = Tidak Bermakna

menggunakan uji *one way ANOVA* (Tabel 2).

Hasil uji *one way ANOVA* menunjukkan ada perbedaan yang bermakna pada nilai densitas optik masing-masing lama perendaman kontrol dengan nilai probabilitas = 0,000 ($p < 0,05$). Untuk menentukan perbedaan kemaknaan antar perlakuan dan kontrol dilakukan uji *Tukey HSD* pada $\alpha=0,05$. Hasilnya dapat dilihat pada Tabel 3.

Pengujian *Tukey HSD* pada Tabel 2, menunjukkan bahwa ada perbedaan antara masing-masing kelompok lama perendaman 1 jam, 12 jam, 24 jam, 48 jam terhadap kontrol, tetapi antar masing-masing kelompok lama perendaman tidak berbeda bermakna, berarti lama perendaman bahan *cyanoacrylate veneer* dalam media kultur sel tidak akan mempengaruhi nilai densitas optik formazan.

Pembahasan

Salah satu kelebihan *cyanoacrylate veneer* adalah mempunyai daya lekat yang sangat kuat. Neihart¹³ menyatakan bahwa kopolimerisasi *methyl methacrylate* dengan *cyanoacrylate* (*cyanoacrylate* yang ditambahkan pada polimer akrilik) mempunyai perlekatan yang menguntungkan.

Bahan *cyanoacrylate veneer* mengandung bahan *polymethyl methacrylate* dan *methyl methacrylate* yang akan berpolimerisasi. Polimerisasi merupakan proses yang pada kenyataannya tidak pernah dapat berlangsung sempurna, sehingga pada akhir polimerisasi selalu terdapat sejumlah monomer yang tidak bereaksi menjadi polimer.¹⁴ Selain itu menurut Cummins dalam OSHA¹⁵ mengatakan bahwa *alkyl-2-cyanoacrylate* bersifat mengiritasi. Untuk membuktikannya maka

dilakukan uji sitotoksitas secara invitro pada kultur sel *BHK-21* menggunakan *MTT assay*.

Kultur sel *BHK-21* digunakan pada penelitian ini karena sel *BHK-21* berasal dari fibroblas ginjal bayi hamster. Sel fibroblas merupakan sel terpenting pada komponen terbesar dari pulpa, ligamen periodontal, dan ginviva.¹⁶

Pada penelitian ini, nilai rerata densitas optik formazan bahan *cyanoacrylate veneer* yang direndam dalam saliva buatan selama 1, 12, 24, 48 jam dan kontrol dilakukan perhitungan statistik menggunakan *one-way ANOVA* menunjukkan ada perbedaan yang bermakna antara variasi lama perendaman dengan kontrol. Selanjutnya dilakukan analisis dengan *Tukey HSD* pada taraf kemaknaan 5% antar variasi lama perendaman artinya tidak terjadi perbedaan bermakna.

MTT assay berdasarkan pada kemampuan sel hidup untuk mereduksi garam *MTT*. Prinsip *assay* ini adalah pemecahan cincin *tetra-zolium MTT* yang berwarna kuning oleh adanya dehidrogenase pada mitokondria yang aktif, menghasilkan produk formazan biru keunguan yang tidak larut. Mekanismenya adalah garam *tetrazolium* berwarna kuning tersebut akan direduksi didalam sel yang mempunyai aktivitas metabolik. Yang mempunyai peranan penting dalam hal ini adalah mitokondria dari sel hidup yang menghasilkan dehidrogenase. Bila dehidrogenase tidak aktif karena efek sitotoksik, maka formazan tidak akan terbentuk.¹⁷ Produksi formazan dapat dihitung dengan melarutkannya dan mengukur densitas optik dari larutan yang dihasilkan. Reaksi warna biru keunguan digunakan sebagai ukuran dari Σ sel hidup. Jumlah sel hidup dapat diukur sebagai hasil produk *MTT* dengan

spektrofotometer pada panjang gelombang 540-570 nm⁷ sehingga prosentase densitas optik yang semakin tinggi menunjukkan sel yang metabolik aktif dapat mereduksi *MTT* juga semakin baik.

Proses kematian sel, kemungkinan karena terdapat kandungan sisa monomer dari resin yang mengandung *polymethyl methacrylate* dan kandungan *cyanoacrylate*. *Cyano veneer* mengandung *ethyl-2-cyanoacrylate*. *Ethyl-2-cyanoacrylate* bila bereaksi dengan air akan membentuk polimer padat.¹⁷ Tidak adanya perbedaan antar waktu perendaman kemungkinan karena aplikasi *fast* pada permukaan sampel yang setelah direndam dalam saliva menjadi polimer padat. Kemungkinan hal itu yang menyebabkan tidak adanya perbedaan yang bermakna antar variasi lama perendaman. Didukung oleh *compendium cyano veneer* yang menyatakan bahwa *ethyl-2-cyanoacrylate* tidak larut dalam air sehingga dinyatakan kompatibel terhadap pulpa serta kompatibel secara histologis.

Prosentase nilai densitas optik yang terendah adalah 86,9509% didapat dari hasil perendaman bahan *cyanoacrylate veneer* yang direndam dalam media kultur sel selama 48 jam. Berarti pada perendaman tersebut jumlah sel hidup lebih dari 50%, sehingga bahan tersebut masih aman dipakai karena Telli *et al*¹² menyatakan bahwa parameter toksisitas berdasarkan CD_{50} , artinya suatu bahan dikatakan toksik apabila prosentase sel hidup setelah terpapar bahan tersebut kurang dari 50 %.

Kesimpulan

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa perendaman bahan *cyanoacrylate veneer* dalam saliva buatan selama 1, 12, 24, 48 jam mempunyai efek sitotoksisitas terhadap sel BHK-21, tetapi prosentase sel BHK-21 yang hidup akibat terpapar bahan *cyanoacrylate veneer* masih diatas 86,95%, yang berarti belum dapat dikatakan toksik.

Daftar Pustaka

1. O'Brien WJ, Ryge G. *An Outline of Dental Materials and Their Selection*. Philadelphia: WB. Saunders Co. 1978: 78-9, 83, 86, 89, 94.
2. Compendium Cyano Veneer. Meyer-Haake medizin-und dentalhandels. E-mail : meyerhaake-export @ 1-online. De Internet : www.Meyer-haake.de
3. American Dental Association (ADA) *Guide to Dental Materials and Devices*, 7th ed. Chicago: American Dental Association 1974: 97-102, 203-8.
4. American Dental Association (ADA). *Dentist's desk reference materials, instruments and equipment*, 2nd ed. Chicago: American Dental Association 1983: 116, 122.
5. Lehman RR. Ethyl-2-Cyanoacrylate as a Tissue Adhesive for External Use Universitas Munster. E-mail: lehmr @ Unimuenster.de, dr.r.r.lehmann @ t-online.de 1997.
6. Soepranto Maat. *Kultur Jaringan (Hewan)*. Surabaya: Universitas Airlangga, Program Pasca Sarjana 1999: 1-70.
7. Fazwishni S dan Hadijono BS. Uji sitotoksisitas dengan esei MTT. *JKGUI* 2000; 7 : 28-32.
8. Kasugai S, Hasegawa N, Ogura H. Application of the MTT colorimetric assay to measure cytotoxic effects of phenolic compound on established Rat pulp cells. *J Dent Res* 1991; 70: 127-30.
9. Noort RV. *Introduction to Dental Material*. London: Mosby Co. 1994: 89-105.
10. Marais JT, Dann Heimer MF, Germis Hugs PJ, Borman JW. Dept of Cured of light cured composite resin with light curing units of defference intencity. *J Dent Assoc* 1997; 52 (6): 403-7.
11. Suprpto-Maat. Sterilisasi dan disinfeksi. Ceramah Sehari Penyucihamaan (Sterilisasi) Sarana Pelayanan Kesehatan. Patologi Klinik RSUD Dr. Soetomo. Surabaya, 2001: 14.
12. Telli C, Serper A, Dogan AL, Guc D. Evaluation of the cytotoxicity of calcium phosphate root canal sealers by MTT assay. *J Endodon* 1999; 25: 811-3
13. Neihart TR. Cyanoacrylate veneer facing: An alternate approach. *J Prosthet Dent* 1984; 51(6): 777-9.
14. Phillips RW. *Science of Dental Materials*, 9th ed. Philadelphia: WB. Saunders Co. 1991: 250,273-4, 312.
15. United States Occupational Safety & Health administration (OSHA). 1985. Methyl 2-Cyanoacrylate (MCA) Ethyl 2-Cyanoacrylate (ECA). Available from: <http://www.Oshasc.gov/dts/sltc/methods/organic/org055/org055.html>.
16. Freshney RI. *Culture of animal cells, a manual of basic technique*, 2nd edition. New York: Alan R. Lises Inc. 1987: 9, 71, 128, 239.
17. Concise International Chemical assesment (CICAD) Document 36. 2001. Methyl Ethyl Cyanoacrylate. (online). Available from: <http://www.inchem.org/documents/cicads/cicad36.htm>.