

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

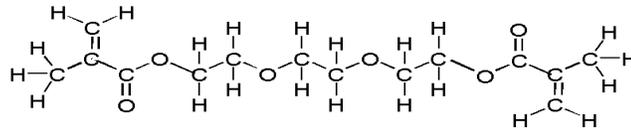
2.1 Resin Komposit

Resin komposit merupakan salah satu kelompok material restoratif berwarna gigi.² Selain itu kini resin komposit digunakan untuk berbagai perawatan dalam bidang kedokteran gigi: sebagai material *fissure sealant*, semen untuk restorasi *indirect*, dan semen untuk bracket orthodonti.^{2,4,14} Pengembangan resin komposit terjadi sekitar tahun 1960 ketika Bowen mengkombinasikan keunggulan epoksi dan akrilat sehingga percobaannya menghasilkan pengembangan molekul *Bisphenol-A-glycidyl dimethacrylate* (Bis-GMA), yang sampai kini digunakan sebagai matriks resin.² Bis-GMA merupakan cairan yang sangat kental. Untuk meningkatkan kualitas pencampuran monomer, *diluent* dengan viskositas rendah, seperti *Triethylene Glycol Dimethacrylate* (TEGDMA) ditambahkan ke dalam matriks resin.^{2,4,15-6} Selain monomer, bahan tambahan lain yang ditambahkan dengan konsentrasi yang kecil ke dalam matriks resin antara lain: partikel pengisi (*filler*), *coupling agent*, bahan aktivator-inisiator, penghambat, penyerap sinar ultraviolet, pigmen dan pembuat opak.^{2,15-6}

2.2 *Triethylene Glycol Dimethacrylate* (TEGDMA)

TEGDMA merupakan suatu dimetakrilat berviskositas rendah dan memiliki berat molekul yang rendah.^{2,17} Konsentrasi TEGDMA yang terdapat dalam resin komposit bervariasi antara 30% sampai 50%.¹ Selain sebagai bahan pengencer, penambahan monomer dimetakrilat ini memungkinkan ikatan silang ekstensif yang memberikan sejumlah jembatan antara makromolekul untuk membentuk jalinan tiga dimensi yang mengubah kekuatan, kelarutan dan penyerapan air dari resin.² Namun Kalachandra, dkk melaporkan bahwa mencampurkan komposit dengan TEGDMA memberikan efek yang kurang diinginkan karena meningkatkan

penyerapan air dan pengerutan saat polimerisasi.¹⁸ Struktur kimia TEGDMA dapat dilihat pada gambar 2.1



Gambar 2.1. Struktur Kimia TEGDMA¹¹

TEGDMA bersifat hidrofilik, selain itu TEGDMA dapat melarutkan lapisan lipid membran sel sehingga dapat berpenetrasi ke dalam sel.¹⁹ TEGDMA dapat terlepas ke rongga mulut dalam beberapa menit hingga beberapa jam setelah aplikasi resin komposit karena polimerisasi yang tidak sempurna.^{1,3} Untuk mencegah efek yang merugikan pulpa dalam tindakan restorasi resin komposit pada kavitas yang dalam, maka diperlukan polimerisasi resin komposit yang sempurna. Resin yang tidak sempurna mengeras akan membuat semakin tingginya konsentrasi residu monomer yang tidak terpolimerisasi untuk mencapai pulpa.² TEGDMA yang terlepas dari resin komposit akan larut dalam saliva dan dapat berdifusi mencapai dentin dan pulpa.⁴

Beberapa peneliti menyatakan bahwa TEGDMA yang terlepas dari resin komposit setelah polimerisasi menyebabkan berbagai efek yang merugikan, termasuk reaksi inflamasi, sitotoksik, mutagenesis dan apoptosis.¹ Engelmann, dkk melaporkan bahwa TEGDMA bersifat toksik terhadap sel fibroblas gingiva manusia.²⁰ Kemudian Stanislawski, dkk menyatakan TEGDMA tidak hanya toksik terhadap sel fibroblas gingival tetapi juga terhadap sel fibroblas pulpa manusia.²¹ Peneliti lainnya, Chen melaporkan bahwa TEGDMA bersifat toksik terhadap sel epitel mulut manusia.²²

Theilig, dkk melaporkan TEGDMA dapat menghambat proliferasi sel fibroblas dan sel keratinosit manusia pada konsentrasi 0,25 mM.²³ Pada penelitian yang dilakukan oleh Janke, dkk, paparan TEGDMA 5 mM dan 7,5 mM selama 24 jam menyebabkan apoptosis sel fibroblas manusia.²⁴

Hasil penelitian Christine, dkk melaporkan bahwa TEGDMA menimbulkan

Universitas Indonesia

efek toksik terhadap sel pulpa gigi, dengan penurunan viabilitas sel, konsentrasi protein total sel dan medium kultur yang signifikan pada aplikasi TEGDMA dengan konsentrasi 8mM.¹³

Di samping bersifat sitotoksik, TEGDMA juga menimbulkan berbagai reaksi yang tidak menguntungkan. TEGDMA dapat menyebabkan dermatitis kontak dan *paresthesia* ujung jari pada *dental personnel*.¹ TEGDMA juga dilaporkan dapat menimbulkan reaksi alergi berupa hipersensitivitas pernapasan dan urtikaria pada pasien.²⁵

2.3 Sel-sel Pulpa Gigi

Pulpa adalah jaringan lunak yang berasal dari mesenkim, terletak di tengah-tengah rongga pulpa.⁶ Pulpa terdiri dari beberapa lapisan: lapisan odontoblas, *cell-free zone*, *cell-rich zone* dan inti pulpa.²⁶ Di dalam pulpa terdapat beberapa elemen jaringan, termasuk saraf, pembuluh darah, serat jaringan ikat, substansi dasar, cairan interstisial, odontoblas, fibroblas, komponen sel imun, dan komponen selular lainnya.²⁷

a) Odontoblas

Odontoblas merupakan sel paling utama pada jaringan pulpa karena berperan dalam dentinogenesis baik selama pembentukan gigi maupun maturasi gigi.^{6,27} Selama dentinogenesis, odontoblas membentuk tubulus dentin dan adanya odontoblas dalam tubulus mendukung dentin menjadi jaringan hidup.²⁷

Odontoblas memiliki ciri-ciri yang mirip dengan osteoblas dan sementoblas. Setiap sel ini memproduksi matriks yang tersusun oleh serat kolagen dan proteoglikan yang mampu melangsungkan proses mineralisasi. Karakteristik mikrostruktur odontoblas menunjukkan banyaknya retikulum endoplasma kasar, badan golgi, granula sekretori, dan sejumlah mitokondia. Sel ini juga mengandung banyak RNA dan terdiri dari satu atau lebih nukleus. Ini semua merupakan karakteristik umum dari sel yang mensekresi protein.²⁷

b) Fibroblas

Fibroblas merupakan sel yang paling banyak terdapat pada pulpa, tepatnya pada lapisan inti pulpa.^{6,26} Dapat berasal dari sel mesenkimal pulpa yang tidak berkembang atau dari bagian fibroblas yang sudah ada.⁹ Sel fibroblas matang berbentuk gepeng dengan inti bulat.²⁷ Fungsi fibroblas adalah menghasilkan substansi dasar dan serabut kolagen tipe I dan tipe III yang merupakan matriks pulpa.^{9,28} Fibroblas juga berperan dalam degradasi kolagen dan deposisi jaringan yang mengalami kalsifikasi, dapat membuat dentikel dan dapat berkembang untuk menggantikan odontoblas mati, dengan kemampuan untuk membentuk dentin reparatif.⁹

c) Sel Mesenkimal yang tidak Berkembang

Sel mesenkimal yang tidak berkembang berasal dari sel mesenkimal papila gigi. Namun sel ini dapat berkembang menjadi fibroblas, odontoblas, makrofag, atau osteoklas sebagai fungsinya dalam perbaikan dan regenerasi. Pada umumnya sel-sel ini berlokasi di sekitar pembuluh darah pada *cell-rich zone*.⁹

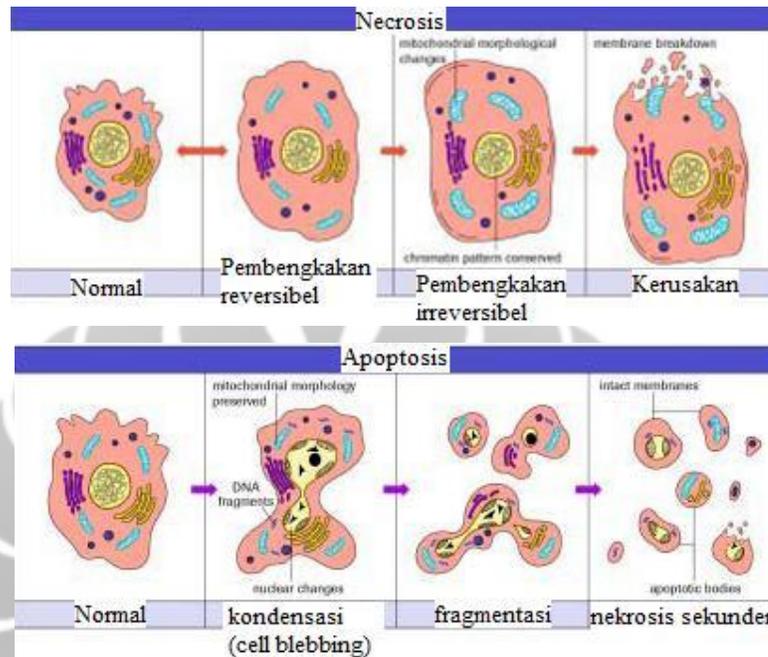
Sel mesenkimal yang tidak terdiferensiasi ini juga dikenal sebagai *dental pulp stem cells* (DPSCs). Gronthos, dkk telah mengidentifikasi keberadaan populasi sel pada pulpa gigi yang diduga sebagai *post-natal* DPSCs. DPSCs dapat merespon sinyal spesifik dari lingkungan sekitar.²⁹

d) Komponen sel-sel imun

Komponen sel-sel imun yang terdapat di dalam pulpa antara lain: makrofag, limfosit T dan sel-sel dendritik. Sel-sel tersebut berperan pada mekanisme pengawasan dan respon awal dari pulpa dalam menghancurkan antigen seperti sel-sel mati dan benda asing.⁶

Setiap sel dapat mengalami apoptosis dan nekrosis, begitu juga sel pulpa. Nekrosis merupakan proses pasif, hasil kerusakan selular karena kehilangan fungsi protein atau integritas membran plasma. Apoptosis

merupakan kematian sel yang terprogram, prosesnya aktif, distimulasi dari faktor perkembangan atau lingkungan.²⁴ Ilustrasi gambaran morfologi apoptosis dan nekrosis seperti pada gambar 2.2



Gambar 2.2 Gambaran Morfologi Apoptosis dan Nekrosis³⁰

2.4 Kultur Sel

Sel merupakan unit fungsional terkecil dan kompleks yang menyusun suatu organisme, sehingga sulit untuk melihat struktur dan komposisi molekul-molekulnya serta fungsi berbagai komponennya.¹² Pada organisme multiselular, setiap sel mengekspresikan berbagai aktivitas yang berbeda dan memiliki peran masing-masing untuk mensekresi suatu produk, mentransmisi impuls listrik atau menjalankan peran lainnya untuk memenuhi fungsi spesifik kehidupan organisme.³¹ Kultur sel merupakan proses pengkondisian yang membuat sel dapat hidup secara terkontrol, berkembang dan menunjukkan sifat-sifat diferensiasi pada *tissue-culture dish*. Saat ini kultur sel telah menjadi salah satu objek utama dalam berbagai penelitian tentang kehidupan.¹⁰

Sel yang terisolasi dapat tumbuh pada *tissue-culture dish* dengan memberikan temperatur yang stabil menggunakan inkubator dan

Universitas Indonesia

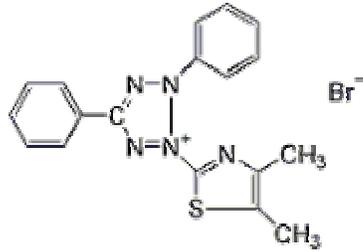
mendapatkan suplemen dari medium yang mengandung nutrisi sel dan faktor pertumbuhan sel. Penggunaan laminar flow dapat menciptakan lingkungan kerja yang meminimalisasi kemungkinan terjadinya kontaminasi.³¹

Kultur sel yang dipisahkan langsung dari jaringan aslinya disebut kultur sel primer. Sel diseparasi secara mekanis atau enzimatik menjadi suspensi sel dan dibiakkan dalam medium kultur.³¹ Selama proses inkubasi sel akan berkembang dengan cara pembelahan dan pembesaran sel. Subkultur dapat dilakukan untuk mencegah kematian sel, dengan cara memindahkan kultur tersebut ke beberapa medium baru dan sel dipindahkan dengan cara mekanis (*cell scraper*).³²⁻³

Keuntungan kultur sel adalah lingkungannya (pH, suhu, nutrisi pertumbuhan) dapat diatur, dapat menggambarkan karakteristik sel, mudah diukur, dan lebih etis daripada menggunakan hewan percobaan. Namun, kultur sel juga memiliki keterbatasan seperti mudah terkontaminasi, ketidakstabilan genetik dan fenotip, serta membutuhkan biaya yang relatif mahal.³⁴ Untuk mengatasi masalah kontaminasi dapat diberikan penambahan bahan kimia yang dapat mencegah pertumbuhan bakteri atau jamur seperti antibiotik dan antijamur.²⁹

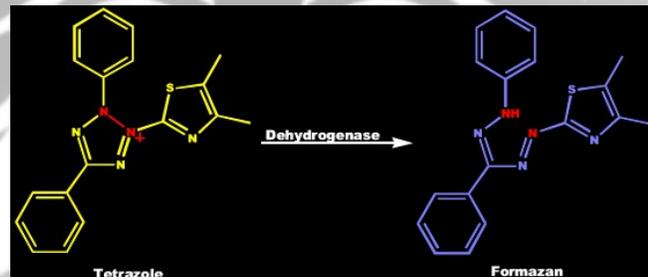
2.5 Viabilitas Sel

Viabilitas sel merupakan pengukuran hidup atau matinya sel. Sitotoksitas yang terjadi pada sel biasanya diindikasikan dengan penurunan proliferasi sel, viabilitas sel, dan sintesis asam nukleat atau protein.¹⁰ Viabilitas sel menunjukkan respon sel yang bersifat segera, seperti perubahan permeabilitas membran atau gangguan pada jalur metabolisme tertentu. Oleh karena itu, viabilitas sel dapat menjadi indikator sitotoksitas suatu bahan.³⁴ Salah satu tes sitotoksitas yang sering digunakan untuk menguji viabilitas sel adalah *3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay*.³⁵ *MTT assay* dikembangkan oleh Mosmann pada tahun 1983. MTT merupakan bahan kimia yang berwarna kuning dan dapat larut dalam air.³⁵ Struktur kimia MTT dapat dilihat pada gambar 2.3.



Gambar 2.3 Struktur MTT³⁶

Prinsip dasar *MTT assay* adalah mengukur aktivitas selular berdasarkan aktivitas enzim succinic dehydrogenase mitokondria sel untuk mereduksi garam methylthiazol tetrazolium (MTT). Pada proses metabolisme, sel-sel yang hidup akan menghasilkan succinic dehydrogenase mitokondria. Enzim ini akan bereaksi dengan MTT dan membentuk kristal formazan ungu yang jumlahnya sebanding dengan sel yang hidup.³⁷⁻³⁹ Reaksi garam MTT membentuk kristal formazan seperti pada gambar 2.4.



Gambar 2.4 Reaksi Pembentukan Kristal Formazan⁴⁰

Kristal formazan ungu bersifat impermeabel pada membran sel dan tidak larut dalam air.³⁷⁻³⁸ Oleh karena itu, diperlukan pelarut tambahan seperti isopropanol, dimethyl sulfoxide (DMSO) atau larutan deterjen sodium dodecyl sulfate (SDS) yang diencerkan dalam asam hidroklorida (HCl) untuk melarutkan kristal formazan ungu.³⁸⁻³⁹ Kristal formazan ungu yang telah dilarutkan diukur dengan spektrofotometer sehingga menghasilkan nilai absorbansi pada panjang gelombang 490 nm.³⁷ Selanjutnya, viabilitas dinyatakan dengan membandingkan nilai absorbansi kelompok perlakuan dengan kelompok kontrol menggunakan rumus dari In Vitro Technologies sebagai berikut:

Universitas Indonesia

$$\text{Viabilitas Sel (\% dari Kontrol)} = \frac{\text{Nilai absorbansi kelompok Perlakuan}}{\text{Nilai absorbansi kelompok Kontrol}}$$

Jika presentasi viabilitas sel lebih kecil dari 100%, maka material yang dipaparkan pada sel tersebut dikatakan bersifat toksik.⁴⁰

2.6 SDS PAGE dan Profil Protein

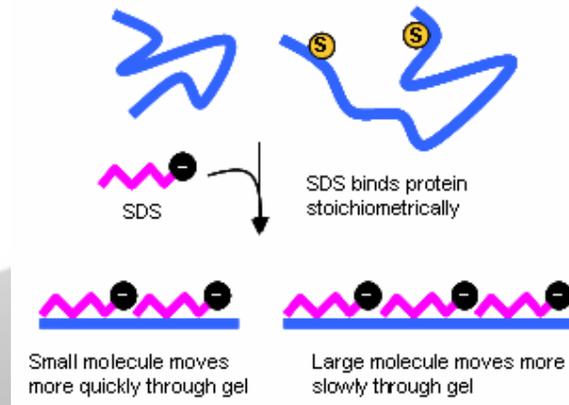
Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) merupakan suatu metode yang digunakan untuk menseparasi semua jenis protein termasuk yang tidak larut dalam air. Prinsip kerja SDS-PAGE melalui pemisahan molekul protein atau asam nukleat berdasarkan laju perpindahannya oleh gaya gerak listrik di dalam matriks gel.¹²

Protein adalah senyawa organik yang terdiri dari asam amino, tersusun dalam rantai linear, dan menyatu dengan ikatan peptida antara kelompok carboxyl dan amino. Protein merupakan bagian yang esensial dalam organisme dan berperan pada setiap proses di dalam sel.⁴¹ Profil protein adalah karakteristik protein dalam sel secara kualitatif. Proporsi relatif profil protein akan mengalami perubahan bermakna pada keadaan patologis. Protein biasanya memiliki muatan positif atau negatif yang menggambarkan campuran muatan asam amino yang terkandung di dalamnya. Hal ini dapat ditentukan melalui *Electrophoresis Gel Test* yang digunakan untuk memisahkan campuran protein. Jika aliran listrik diaplikasikan ke cairan yang mengandung molekul protein, protein akan berpindah sesuai dengan muatan dan ukuran serta bentuknya.¹²

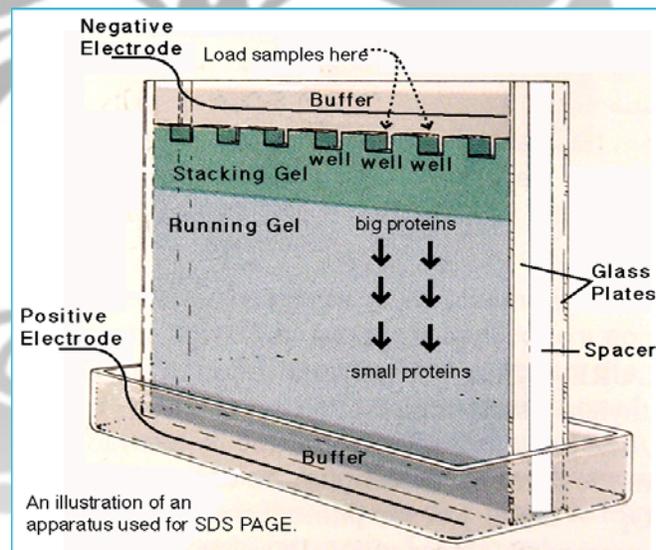
SDS-PAGE menggunakan *highly cross-linked* gel poliakrilamid sebagai matriks untuk perpindahan protein. SDS merupakan detergen yang mengikat bagian hidrofobik dari molekul protein, yang menyebabkan protein terbentang menjadi rantai polipeptida yang bentuknya memanjang. Campuran SDS dan protein akan menyebabkan setiap molekul protein mengikat sejumlah besar muatan negatif molekul detergen yang meliputi muatan intrinsik protein dan menyebabkan protein bermigrasi ke elektroda positif ketika tegangan diaplikasikan.¹² Hasil perpindahan molekul protein dinyatakan dalam *band-band* yang terbentang dalam satu lintasan lurus.

Universitas Indonesia

Protein dengan berat molekul yang kecil akan berpindah lebih cepat dibandingkan dengan yang berat molekulnya besar.⁴² *band-band* ini dapat terlihat setelah proses pewarnaan (*staining*).⁴¹



Gambar 2.5 Gambaran SDS Mengikat Protein⁴²



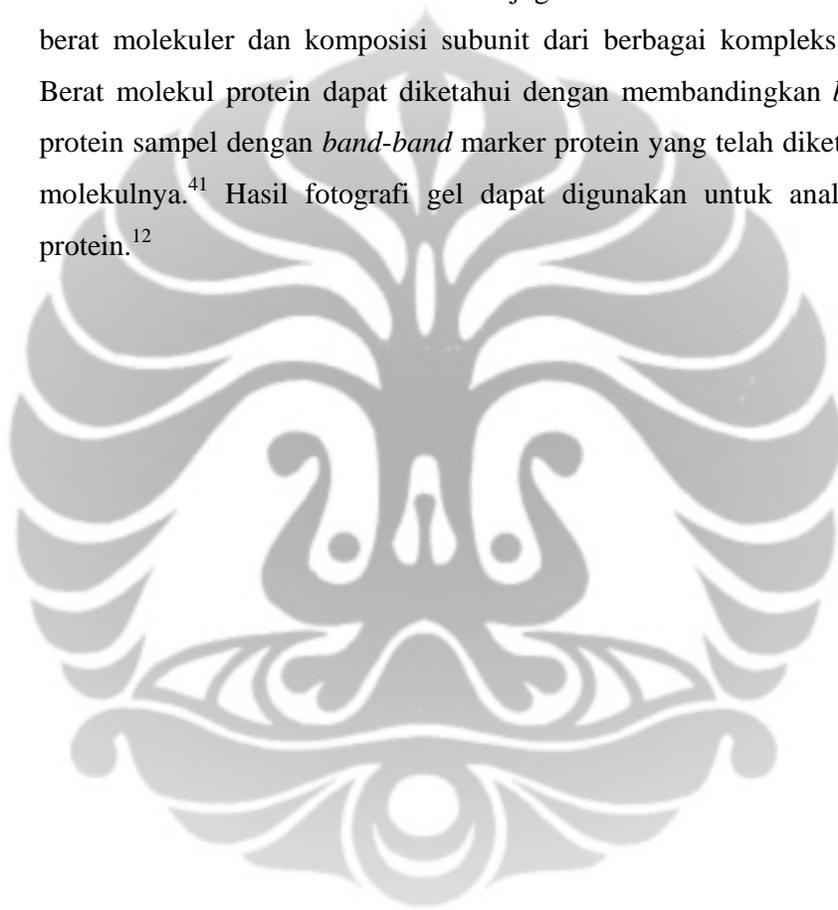
Gambar 2.6 Ilustrasi *running* SDS-PAGE⁵⁵

Prosedur pewarnaan berguna untuk mewarnai *band-band* yang muncul sehingga dapat dideteksi keberadaan *band-band* tersebut. Pewarna yang umum digunakan ialah Coomassie blue.⁴³ Coomassie blue merupakan pewarna yang sensitif untuk deteksi *band-band* dalam gel poliakrilamid. Pewarnaan dengan Coomassie memberikan warna biru pada *band* dengan sensitivitas 50 – 100 ng/*band*.⁴⁴ Neuhoff menyatakan bahwa Silver Stain

Universitas Indonesia

merupakan salah satu metode tambahan dari pewarnaan Coomassie Blue tipe R dan G. Switzer menyatakan Silver Stain merupakan teknik yang sangat sensitif untuk visualisasi protein dengan level deteksi 0,3 – 10 ng. Mekanisme dasar deteksi protein berdasarkan ikatan ion silver pada rantai asam amino dalam kondisi pH netral, terutama pada kelompok sulfhydryl dan carboxyl, diikuti dengan reduksi silver metalik bebas. *Band* protein terlihat sebagai noda di tempat terjadinya reduksi.⁴⁵

Band-band hasil SDS-PAGE juga memberikan informasi tentang berat molekuler dan komposisi subunit dari berbagai kompleks protein.¹² Berat molekul protein dapat diketahui dengan membandingkan *band-band* protein sampel dengan *band-band* marker protein yang telah diketahui berat molekulnya.⁴¹ Hasil fotografi gel dapat digunakan untuk analisis profil protein.¹²



2.7 Kerangka Teori

