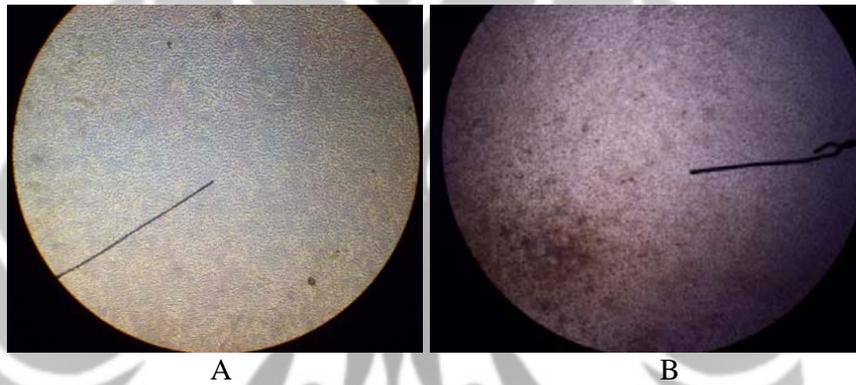


## BAB 5

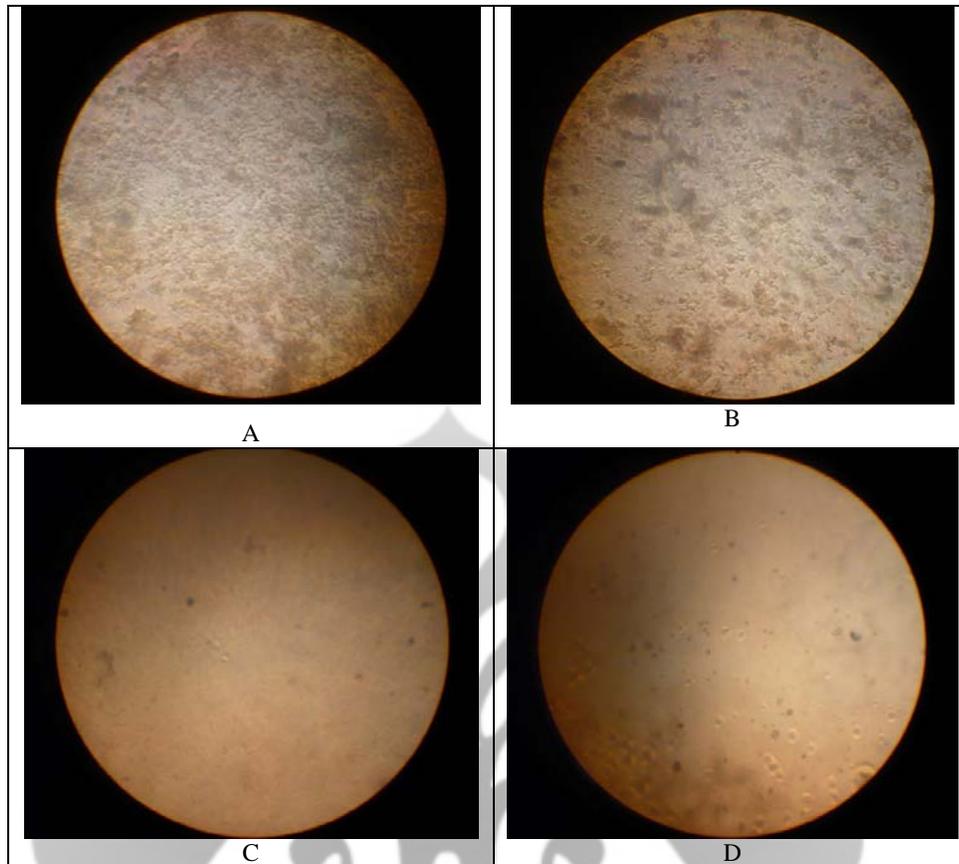
### HASIL PENELITIAN

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah sel pulpa yang merupakan hasil subkultur dari kultur primer sel pulpa gigi sehat. Gambaran mikroskopis kultur sel primer dan subkultur sel-sel pulpa gigi dapat dilihat pada gambar 5.1.



**Gambar 5.1.** Gambaran mikroskopis kultur sel pulpa gigi dengan pembesaran 4X (0.10), pemotretan menggunakan *digital camera* Kodak M853, sel tampak *confluent* **A.** kultur primer sel-sel pulpa gigi pada cawan petri setelah inkubasi  $\pm$  2 malam **B.** subkultur sel pulpa gigi pada 24-well plate setelah inkubasi 1 malam.

Pada penelitian ini sampel dibagi menjadi dua kelompok, yaitu kelompok kontrol dan kelompok perlakuan. Pada kelompok kontrol sampel tidak dipaparkan TEGDMA, sedangkan pada kelompok perlakuan sampel dipaparkan TEGDMA dengan konsentrasi 4 mM, 8 mM, dan 12 mM yang diinkubasi selama 24 jam pada kondisi suhu 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Gambar mikroskopis kultur sel-sel pulpa gigi setelah terpapar dengan TEGDMA 4 mM, 8 mM, dan 12 mM selama 24 jam dapat dilihat pada gambar 5.2.



**Gambar 5.2.** Gambaran mikroskopis kultur sel-sel pulpa gigi setelah pemajanan TEGDMA dan inkubasi selama 24 jam dengan pembesaran 4X (0.10.), pemotretan menggunakan *digital camera* Kodak M853. **A.** Kelompok kontrol **B.** Kelompok uji dengan pajanan TEGDMA 4 mM **C.** Kelompok uji dengan pajanan TEGDMA 8 mM **D.** Kelompok uji dengan pajanan TEGDMA 12 mM.

Pada Gambar 5.2 (A-D) dapat dilihat gambaran mikroskopis kultur sel-sel pulpa gigi setelah pemaparan TEGDMA selama 24 jam. Dapat dilihat terjadi penurunan kepadatan sel pada semua kelompok perlakuan seiring dengan peningkatan konsentrasi TEGDMA.

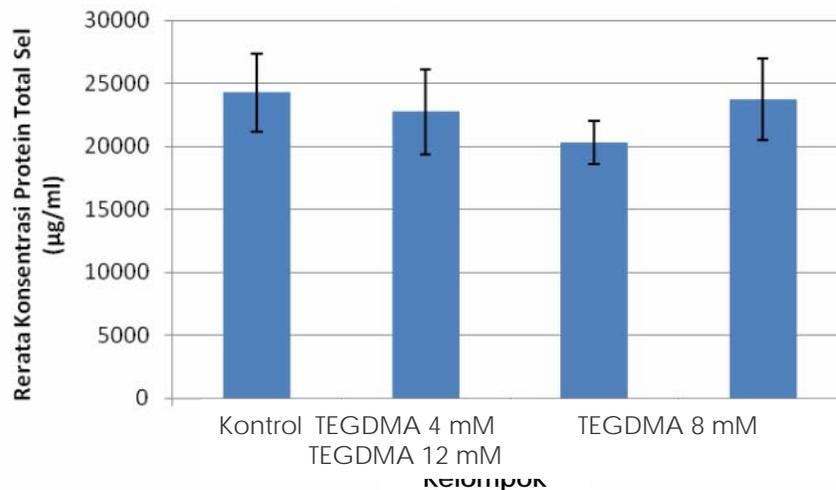
Pada penelitian ini, efek TEGDMA ditentukan berdasarkan konsentrasi protein total dan profil protein sel-sel pulpa gigi pada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan TEGDMA 4 mM, 8 mM, dan 12 mM. Konsentrasi protein total sel pulpa gigi diukur dengan metode *Bradford protein assay* dan dibaca dengan *microplate reader*, dengan panjang gelombang 655 nm. Sedangkan profil protein diidentifikasi dengan menggunakan teknik SDS-PAGE. Hasil pengukuran konsentrasi protein total sel pulpa gigi dapat dilihat pada tabel 5.1 dan gambar 5.3

**Universitas Indonesia**

**Tabel 5.1.** Rerata konsentrasi protein total sel ( $\mu\text{g/ml}$ ) pada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan setelah pemaparan TEGDMA

KELOMPOK	N	Rerata $\pm$ SD ( $\mu\text{g/ml}$ )
Kontrol	10	24253,77 $\pm$ 3072,88
TEGDMA 4 mM	9	22762,27 $\pm$ 3385,87
TEGDMA 8 mM*	8	20268,44 $\pm$ 1701,14
TEGDMA 12 mM	10	23706,51 $\pm$ 3214,52

\* memiliki perbedaan yang signifikan dengan kelompok kontrol ( $p < 0,05$ )



**Gambar 5.3.** Diagram rerata konsentrasi protein total sel kelompok kontrol dan kelompok perlakuan setelah pemaparan TEGDMA.

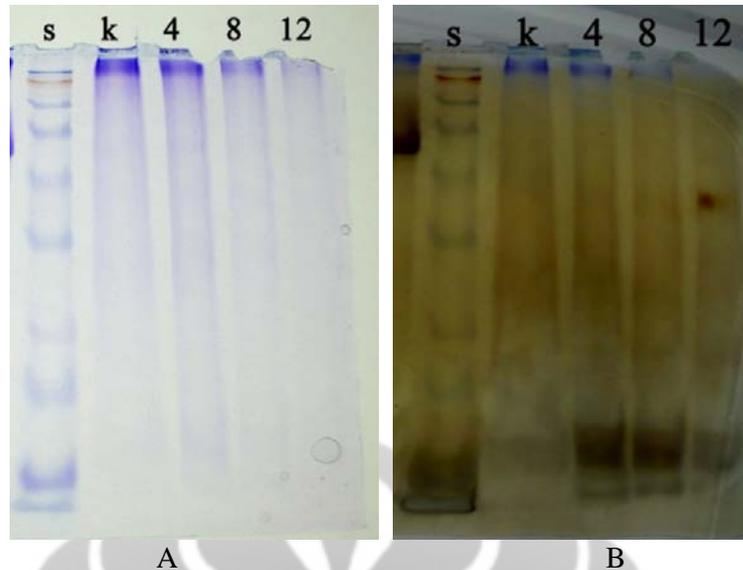
Uji normalitas data dengan *Shapiro-Wilk* menunjukkan bahwa data mempunyai distribusi normal ( $p > 0,05$ ). Data tersebut juga homogen berdasarkan hasil tes homogenitas pada analisis statistik dengan *one way ANOVA* ( $p > 0,05$ ) (lampiran 2). Uji beda nilai rerata antara kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan dan antara kelompok perlakuan diuji dengan *one way ANOVA*. Hasil uji statistik dapat dilihat pada tabel 5.2.

**Tabel 5.2.** Hasil uji *one way ANOVA* konsentrasi protein total sel antara kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan, dan antara kelompok perlakuan.

TEGDMA	Rerata ( $\mu\text{g/ml}$ ) $\pm$ SD	Sig
Kontrol	24253,771 $\pm$ 3072,881	
4 mM	22762,270 $\pm$ 3385,868	0.969
Kontrol	24253,771 $\pm$ 3072,881	
8 mM	20268,442 $\pm$ 1701,143	0.037*
Kontrol	24253,771 $\pm$ 3072,881	
12 mM	23706,508 $\pm$ 3214,520	0.976
4 mM	22762,270 $\pm$ 3385,868	
8 mM	20268,442 $\pm$ 1701,143	0.325
4 mM	22762,270 $\pm$ 3385,868	
12 mM	23706,508 $\pm$ 3214,520	0.899
8 mM	20268,442 $\pm$ 1701,143	
12 mM	23706,508 $\pm$ 3214,520	0.089

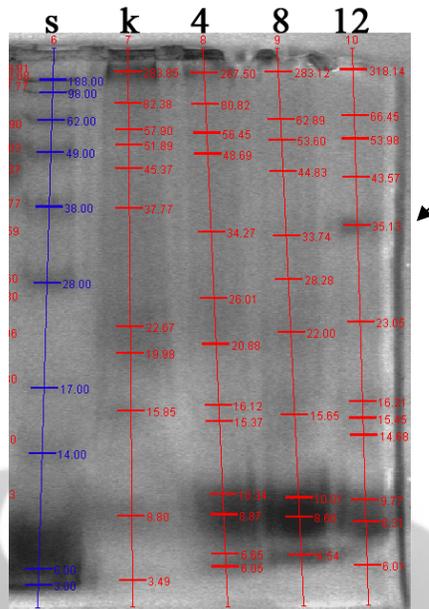
\*  $p < 0.05$  = terdapat perbedaan bermakna

Pada tabel 5.1, gambar 5.3, dan tabel 5.2 menunjukkan penurunan konsentrasi protein total sel-sel pulpa gigi pada semua kelompok perlakuan dibandingkan dengan kelompok kontrol yang memiliki nilai rerata ( $\mu\text{g/ml} \pm \text{SD}$ ) 24253,77 $\pm$ 3072,88. Rerata konsentrasi protein total sel pulpa kelompok TEGDMA 4 mM (22762,27 $\pm$ 3385,87) tampak lebih rendah dari kontrol, namun perbedaan tersebut tidak bermakna ( $p > 0.05$ ). Nilai rerata konsentrasi protein total sel kelompok TEGDMA 8 mM (20268,44 $\pm$ 1701,14) tampak paling rendah dibandingkan dengan kelompok kontrol maupun kelompok perlakuan 4 mM dan 12 mM, perbedaan terhadap kelompok kontrol dinyatakan bermakna dengan nilai signifikansi ( $p < 0.05$ ), namun bila dibandingkan dengan kelompok TEGDMA 4 mM secara statistik tidak bermakna ( $p > 0.05$ ). Sedangkan konsentrasi protein total sel kelompok TEGDMA 12 mM (23706,51 $\pm$ 3214,52) lebih tinggi dibandingkan dengan kelompok TEGDMA 4 mM dan 8 mM, namun perbedaan tersebut tidak bermakna dengan nilai signifikansi ( $p > 0.05$ ). Hasil di atas sesuai dengan hipotesis awal yang menyatakan bahwa TEGDMA dapat menurunkan konsentrasi protein total sel pulpa gigi. Selanjutnya profil protein sel-sel pulpa gigi dapat dilihat pada gambar 5.4



**Gambar 5.4.** Gambaran profil protein sel-sel pulpa gigi dengan pewarnaan *Coomassie blue* dan *double staining* oleh *Silver Stain*, pemotretan menggunakan *digital camera* Kodak M853. *Band-band* protein dibentuk oleh protein standar *See BluePlus2 pre-stain standard* (s), kelompok kontrol (k), kelompok perlakuan dengan paparan TEGDMA 4 mM (4), TEGDMA 8mM (8), dan TEGDMA 12mM (12) pada gel elektroforesis. **A.** Gel elektroforesis setelah pewarnaan pertama dengan *Coomassie blue*. **B.** Gel elektroforesis setelah pewarnaan kedua dengan *Silver Stain*, tampak *band-band* dengan berat molekul rendah bermunculan lebih jelas.

Identifikasi secara kualitatif dilakukan dengan membandingkan *band-band* protein kelompok perlakuan terhadap *band* protein kelompok kontrol (Gambar 5.4). Sedangkan analisa perkiraan berat molekul tiap *band* yang terbentuk adalah dengan melihat berat molekul protein standar (*See BluePlus2 pre-stain standard*) seperti pada gambar 5.5. Pada gambar 5.4 tampak perbedaan gambaran profil protein antara kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan, dan antara kelompok perlakuan. Secara umum banyak terdapat tampilan *band-band* protein pada kelompok perlakuan maupun kontrol, namun gambarannya tidak jelas. Pada kelompok perlakuan *band* protein muncul pada berat molekul rendah yang tidak tampak pada kelompok kontrol. Sebaliknya protein dengan berat molekul tinggi yang muncul pada kelompok kontrol tampak makin berkurang ketebalan *band*-nya pada kelompok perlakuan seiring dengan peningkatan konsentrasi pemaparan TEGDMA. Gambaran profil protein ini menunjukkan hasil yang sama pada tiga kali *running* sampel yang berbeda.



**Gambar 5.5.** Gambaran hasil identifikasi berat molekul protein sel pulpa gigi yang dibentuk oleh : protein standar *See BluePlus2 pre-stain standard* (s), kelompok Kontrol (k), kelompok Perlakuan dengan paparan TEGDMA 4 mM (4), TEGDMA 8mM (8), dan TEGDMA 12 mM (12) pada gel elektroforesis yang diperoleh dari pemotretan dengan *Gel-Doc Bio-Rad*. Anak panah : menunjukkan munculnya *band* protein baru dengan berat molekul 35,13 kDa.

Pada gambar 5.5 terlihat berbagai *band* protein dengan rentang berat molekul yang sangat bervariasi baik pada kelompok kontrol maupun pada kelompok perlakuan. *Band* protein yang jelas tampak adalah *band* protein dengan berat molekul  $\pm 82$  kDa dan antara 19-23 kDa pada kelompok kontrol, *band* protein  $\pm 35$  kDa pada kelompok TEGDMA 12 mM, dan *band-band* protein pada kisaran berat molekul 6 kDa dan 8-10 kDa pada kelompok perlakuan TEGDMA 4 mM, 8 mM, dan 12 mM. Dari hasil identifikasi tersebut dapat dilihat bahwa TEGDMA dapat menyebabkan perubahan profil protein secara *in vitro*, sehingga hipotesis kedua diterima.

## BAB 6

### PEMBAHASAN

Pada hasil pengukuran konsentrasi protein total sel pulpa gigi dengan *Bradford protein assay* dalam penelitian ini didapat konsentrasi protein total sel pada semua kelompok perlakuan lebih rendah dibanding dengan kelompok kontrol. Selain itu, identifikasi profil protein sel pulpa gigi dengan menggunakan teknik SDS-PAGE menunjukkan terjadinya perubahan profil protein pada kelompok perlakuan TEGDMA 4 mM, 8 mM, dan 12 mM.

Penurunan konsentrasi protein total sel pada kelompok pemaparan TEGDMA konsentrasi 4 mM dan 8 mM diduga terjadi penurunan sintesis protein akibat kematian sel. Pada tahun 2006 Schweikl H melaporkan bahwa monomer TEGDMA dapat menyebabkan kematian sel pulpa gigi melalui apoptosis dengan meningkatnya *reactive oxygen species* (ROS) setelah penurunan tingkat *glutathione* (GSH) pada sel pulpa gigi.<sup>5</sup> Bernardi dkk, melaporkan bahwa setelah peningkatan kadar ROS dalam sel, terjadi penurunan produksi *adenosine triphosphate* (ATP).<sup>45</sup> Pada kematian atau nekrosis sel pulpa dapat terlihat penurunan sintesis protein dan ATP dalam sel. Kedua hal ini merupakan pengukuran yang baik sekali dan dapat menjadi indikator viabilitas sel yang *reliable*, serta dapat dijadikan tolak ukur suatu toksisitas (Hinkle P, dkk 1987; Nikula K, dkk 1999).<sup>46-7</sup>

Pada penelitian sebelumnya oleh Solina D, dkk melaporkan bahwa TEGDMA dengan konsentrasi terbesar 8 mM menurunkan protein total sel dan medium kultur sel pulpa gigi.<sup>48-9</sup> Berbeda dengan hasil penelitian tersebut, pada penelitian ini dengan konsentrasi TEGDMA lebih tinggi yaitu 12 mM didapat hasil konsentrasi protein total sel lebih tinggi dibandingkan dengan kelompok 4 mM dan 8 mM, tetapi secara statistik tidak bermakna, dan tetap di bawah kelompok kontrol. Perbedaan hasil yang didapat ini diduga karena perbedaan sampel yang digunakan. Pada penelitian Solina D, dkk sampel yang digunakan adalah kultur primer sel pulpa gigi, sedangkan pada penelitian ini sampel yang

digunakan adalah subkultur dari kultur primer, dan pada penelitian tersebut tidak digunakan TEGDMA 12 mM sebagai bahan uji. Selain itu, diduga bahwa peningkatan konsentrasi protein total yang dialami pada kelompok TEGDMA 12 mM berhubungan dengan reaksi sel terhadap stimulus eksternal (dalam penelitian ini adalah TEGDMA), berupa produksi sel-sel inflamasi.

Dari hasil diskusi diatas, dapat disimpulkan bahwa penurunan konsentrasi protein total sel pulpa setelah dipaparkan TEGDMA 4 mM, 8 mM, dan 12 mM menunjukkan adanya toksisitas TEGDMA terhadap sel pulpa gigi. Penurunan protein total sel ini sejalan dengan menurunnya viabilitas sel akibat paparan TEGDMA yang dilaporkan oleh Pardamean R (belum dipublikasikan).<sup>50</sup>

Selanjutnya, identifikasi gambaran profil protein sel pulpa gigi pada penelitian ini didapat dengan teknik SDS-PAGE dengan *double staining* untuk mendapatkan hasil gambaran yang lebih jelas. Pada hasil tampilan *band-band* profil protein pada gel elektroforesis, terdapat perbedaan profil protein antara kelompok perlakuan dengan kelompok kontrol, dan antara kelompok perlakuan. Secara umum banyak terdapat tampilan *band-band* protein pada kelompok perlakuan maupun kontrol, namun dengan gambaran yang kurang jelas.

Pada kelompok TEGDMA 4 mM, 8 mM, dan 12 mM ditemukan *band-band* protein dengan berat molekul  $\pm 82$  kDa dan kisaran 19-23 kDa dan terlihat semakin menipis. Tetapi, tren yang berlawanan terjadi pada *band-band* protein dengan berat molekul rendah. *Band-band* pada kisaran berat molekul 6 kDa dan 8-10 kDa mengalami pelebaran dan penebalan *band* pada kelompok perlakuan 4 mM, 8 mM, dan 12 mM, namun pada kelompok kontrol tidak tampak jelas.

Penipisan *band-band* protein dengan berat molekul  $\pm 82$  kDa dan 19-23 kDa pada kelompok perlakuan TEGDMA 4 mM, 8 mM, dan 12 mM diduga berhubungan dengan efek toksik TEGDMA terhadap sel-sel pulpa gigi. Berbagai penelitian sebelumnya, melaporkan bahwa TEGDMA dapat menyebabkan apoptosis sel.<sup>5,19</sup> Pada proses apoptosis, terjadi penurunan produksi ATP sel yang mengawali kematian sel.<sup>51</sup> Sehingga diduga bahwa penipisan *band* protein yang dialami berhubungan dengan tidak terjadinya sintesis protein yang disebabkan oleh kematian sel.

Penebalan dan pelebaran *band-band* protein dengan berat molekul rendah (pada kisaran 6 kDa dan 8-10 kDa) yang terjadi pada semua kelompok perlakuan diduga merupakan produk sel-sel pulpa, termasuk sitokin sebagai respon inflamasi. Pada penelitian sebelumnya oleh Schmalz G, setelah pemaparan TEGDMA dengan konsentrasi rendah terhadap kultur epitel rongga mulut terdapat kehadiran molekul proinflamatori yaitu interleukin 8 (IL-8).<sup>52</sup> Telah diketahui bahwa IL-8 memiliki berat molekul 6-8 kDa.<sup>53</sup> Sehingga kehadiran *band-band* protein pada kelompok TEGDMA 4 mM, 8 mM, dan 12 mM dengan berat molekul rendah pada penelitian ini kemungkinan merupakan kehadiran IL-8. Dugaan lain mengenai penebalan dan pelebaran *band* protein dengan berat molekul rendah yang terjadi, mungkin merupakan penumpukan protein-protein dengan berat molekul yang setara dan tidak dapat terseparasi dengan baik. Sehingga untuk mengidentifikasi protein-protein tersebut lebih lanjut, dapat diperjelas dengan menggunakan teknik SDS-PAGE 2-dimensi.

Yang menarik pada tampilan *band* protein pada gel elektroforesis dalam penelitian ini adalah tampak adanya protein baru yang terjadi pada kelompok TEGDMA 12 mM dengan berat molekul 35.13 kDa, yang tidak tampak pada kelompok perlakuan lainnya maupun kelompok kontrol. Telah diketahui bahwa enzim *caspase* dan *lactate dehydrogenase* (LDH) mempunyai berat molekul 35 kDa.<sup>54-6</sup> Sehingga protein baru dengan berat molekul 35.13 kDa pada penelitian ini kemungkinan merupakan salah satu dari protein tersebut. Namun, perlu dilakukan penelitian lebih lanjut dengan menggunakan *marker antibody* spesifik untuk mengidentifikasi jenis protein tersebut.