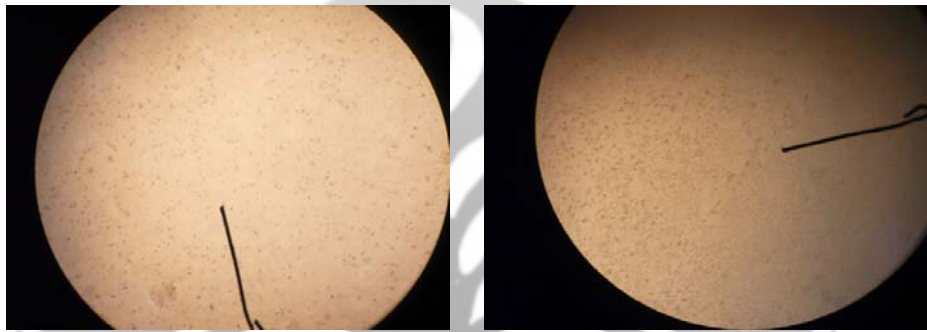


BAB 5

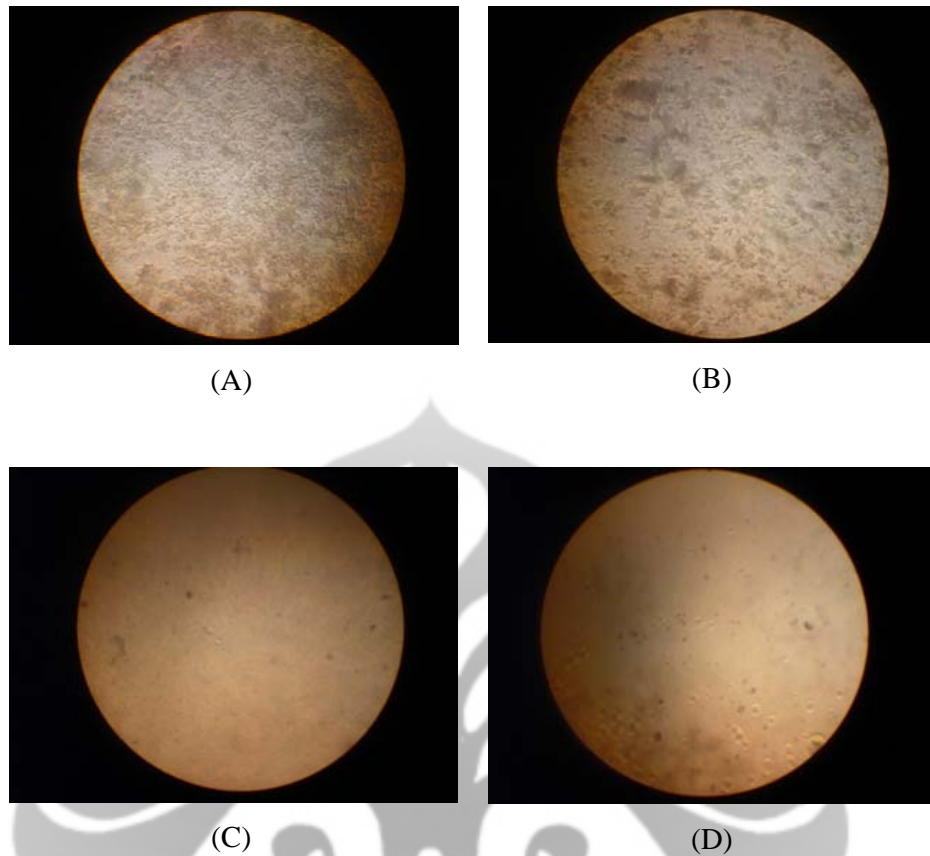
HASIL PENELITIAN

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah sel-sel pulpa 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 perbesaran $4 \times / 0,10$, sel tampak confluent. Pemotretan menggunakan *digital camera* Panasonic DMC-FX10. (A) Kultur sel primer sel-sel pulpa gigi dalam cawan petri setelah inkubasi ± 2 malam (B) Subkultur sel-sel pulpa gigi dalam *24-Well Plate* setelah inkubasi selama 24 jam kemudian.

Sampel dibagi menjadi dua kelompok, yaitu kelompok kontrol dan perlakuan. Kelompok perlakuan terdiri dari tiga kelompok, masing-masing dipaparkan TEGDMA dengan konsentrasi 4 mM, 8mM, dan 12 mM. Sedangkan pada kelompok kontrol, tidak dipaparkan TEGDMA. Kemudian kedua kelompok tersebut diinkubasi pada kondisi suhu 37°C dan 5% CO_2 selama 24 jam. Gambaran mikroskopis kultur sel-sel pulpa gigi setelah terpapar TEGDMA 4 mM, 8 mM, dan 12 mM selama 24 jam dapat dilihat pada gambar 5.2.



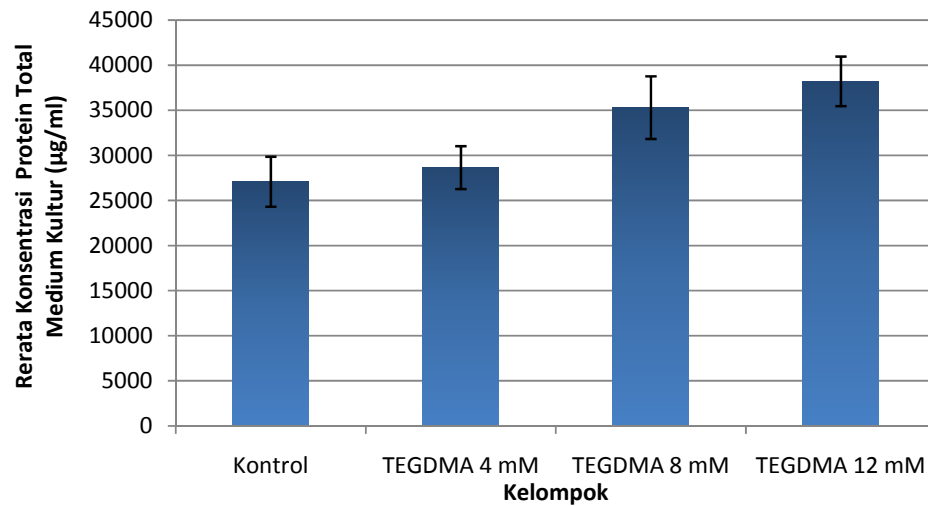
Gambar 5.2. Gambaran mikroskopis kultur sel pulpa gigi setelah terpapar TEGDMA yang diinkubasi selama 24 jam dengan perbesaran $4\times/0,10$. Pemotretan menggunakan *digital camera* Panasonic DMC-FX10. (A) Kontrol, (B) TEGDMA 4 mM, (C) TEGDMA 8 mM, (D) TEGDMA 12 mM

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

Pada penelitian ini, efek TEGDMA terhadap kultur sel-sel pulpa ditentukan berdasarkan konsentrasi protein total dan profil protein medium kultur pada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan 4 mM, 8 mM, dan 12 mM. Protein total medium kultur diukur dengan menggunakan metode *Bradford protein assay* dan dibaca dengan *microplate reader* pada panjang gelombang 655 nm. Hasil pengukuran tersebut dapat dilihat selengkapnya pada tabel 5.1 dan gambar 5.3.

Tabel 5.1. Rerata konsentrasi protein total medium kultur sel pulpa gigi ($\mu\text{g/ml}$) kelompok kontrol dan kelompok perlakuan setelah terpapar TEGDMA.

TEGDMA	N	Rerata ($\mu\text{g/ml}$) \pm SD
Kontrol	4	27073.83 \pm 2772.46
TEGDMA 4 mM	4	28635.85 \pm 2373.39
TEGDMA 8 mM	5	35288.41 \pm 3469.47
TEGDMA 12 mM	6	38199.79 \pm 2752.47



Gambar 5.3. Diagram rerata konsentrasi protein total medium kultur sel pulpa gigi kelompok kontrol dan kelompok perlakuan setelah terpapar TEGDMA.

Data hasil penelitian diatas telah melalui uji normalitas dengan *Shapiro-Wilk* yang menyatakan bahwa data mempunyai distribusi normal ($p > 0,05$). Data tersebut juga dinyatakan homogen berdasarkan hasil tes homogenitas pada analisis statistik dengan *one way ANOVA* ($p > 0,05$), yang dapat dilihat pada lampiran 2. Hasil uji statistik antara kelompok kontrol dengan perlakuan dan antara kelompok perlakuan dapat dilihat pada tabel 5.2.

Tabel 5.2. Hasil uji statistik *one way ANOVA* rerata konsentrasi protein total medium kultur sel pulpa gigi ($\mu\text{g/ml}$) antara kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan dan antara kelompok perlakuan.

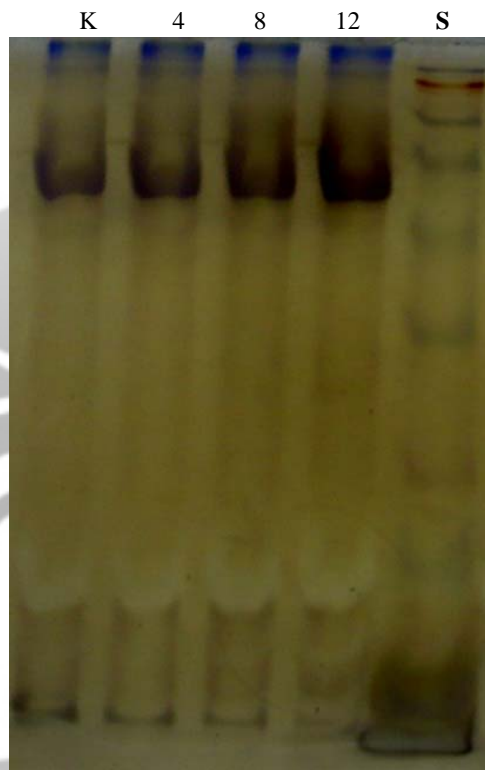
TEGDMA	Rerata ($\mu\text{g/ml}$) \pm SD	Sig
Kontrol	27073.83 \pm 2772.46	0.458
4 mM	28635.85 \pm 2373.39	
Kontrol	27073.83 \pm 2772.46	0.000*
8 mM	35288.41 \pm 3469.47	
Kontrol	27073.83 \pm 2772.46	0.000*
12 mM	38199.79 \pm 2752.47	
4 mM	28635.85 \pm 2373.39	0.004*
8 mM	35288.41 \pm 3469.47	
4 mM	28635.85 \pm 2373.39	0.000*
12 mM	38199.79 \pm 2752.47	
8 mM	35288.41 \pm 3469.47	0.118
12 mM	38199.79 \pm 2752.47	

* $p < 0,05$ = Terdapat perbedaan bermakna

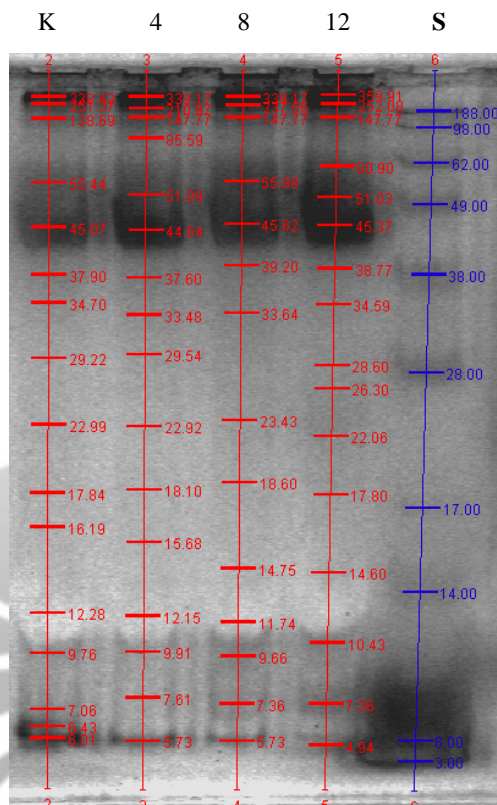
Berdasarkan tabel 5.1, gambar 5.3 dan tabel 5.2 di atas, dapat dilihat bahwa terdapat perbedaan rerata konsentrasi protein total medium kultur antara kelompok perlakuan dengan kelompok kontrol (27073.83 $\mu\text{g/ml}$ \pm 2772.46). Nilai rerata protein total medium kultur sel-sel pulpa gigi setelah dipapar dengan TEGDMA 4 mM (28635.85 $\mu\text{g/ml}$ \pm 2373.39) lebih tinggi dibandingkan dengan kelompok kontrol, namun peningkatan tersebut secara statistik tidak bermakna ($p > 0,05$). Sedangkan nilai protein total pada kelompok perlakuan TEGDMA 8 mM (35288.41 $\mu\text{g/ml}$ \pm 3469.47) dan TEGDMA 12 mM (38199.79 $\mu\text{g/ml}$ \pm 2752.47) mengalami peningkatan bermakna dibandingkan dengan kelompok kontrol ($p < 0,05$). Protein total medium kultur kelompok perlakuan TEGDMA 8 mM dan 12 mM mengalami peningkatan bermakna bila dibandingkan dengan kelompok perlakuan TEGDMA 4 mM ($p < 0,05$), namun protein total kelompok perlakuan TEGDMA 8 mM tidak berbeda bermakna bila dibandingkan kelompok perlakuan TEGDMA 12 mM ($p > 0,05$). Hasil diatas sesuai dengan hipotesis pertama yang menyatakan TEGDMA dapat menyebabkan peningkatan protein total medium kultur sel pulpa.

Selanjutnya, profil protein medium kultur sel-sel pulpa gigi dapat dilihat pada gambar 5.4. Identifikasi secara kualitatif dilakukan dengan membandingkan

band-band protein kelompok perlakuan terhadap *band* protein kelompok kontrol. 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.



Gambar 5.4 **Gambaran profil protein medium kultur sel pulpa gigi dengan pewarnaan double staining.** Pemotretan menggunakan *digital camera* Kodak M853 Keterangan: Kelompok kontrol (K); Kelompok perlakuan dengan paparan TEGDMA 4 mM (4); TEGDMA 8 mM (8); dan TEGDMA 12mM (12); Protein standar *See Blueplus2 Pre-stain Standard* (S).



Gambar 5.5 Gambaran hasil identifikasi berat molekul protein medium kultur sel pulpa gigi pada gel elektroforesis yang diperoleh dari pemotretan dengan Gel-Doc Bio-Rad. Keterangan: Kelompok kontrol (K); Kelompok perlakuan dengan paparan TEGDMA 4 mM (4); TEGDMA 8 mM (8); dan TEGDMA 12 mM (12); Protein standar *See Blueplus2 Pre-stain Standard* (S).

Berdasarkan gambar 5.5 diatas, secara keseluruhan terlihat berbagai *band* protein dengan berat molekul yang bervariasi baik pada kelompok kontrol maupun pada kelompok perlakuan. *Band* protein yang tampak jelas antara lain *band* protein dengan berat molekul pada rentang 45 kDa – 61 kDa pada kelompok kontrol, 4 mM, 8 mM, dan 12 mM. Kemudian *band* protein dengan berat molekul pada rentang 22 kDa - 26 kDa pada kelompok perlakuan 12 mM, dan *band* protein dengan berat molekul kisaran 6 kDa pada kelompok kontrol, dan perlakuan TEGDMA 4 mM, 8 mM, dan 12 mM. Dari hasil identifikasi tersebut, dapat disimpulkan bahwa terjadi perubahan pada susunan *band* protein pada tiap kelompok perlakuan dibandingkan dengan kontrol dan antara kelompok perlakuan itu sendiri. Dengan demikian, hipotesis kedua yang menyatakan bahwa peningkatan konsentrasi TEGDMA dapat menyebabkan perubahan profil protein medium kultur sel pulpa gigi dapat diterima.

BAB 6

PEMBAHASAN

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa TEGDMA 4 mM, 8 mM, dan 12 mM menyebabkan terjadinya peningkatan konsentrasi protein total medium kultur sel-sel pulpa gigi. Selain itu, identifikasi profil protein dengan metode *SDS PAGE* menunjukkan terjadinya perubahan profil protein medium kultur sel-sel pulpa gigi setelah pemaparan TEGDMA 4 mM, 8 mM, dan 12 mM.

Konsentrasi protein total medium kultur kelompok TEGDMA 8 mM dan 12 mM mengalami peningkatan bermakna dibanding kelompok kontrol ($p < 0,05$). Peningkatan konsentrasi protein total medium kultur sel pulpa juga terjadi pada kelompok perlakuan TEGDMA 4 mM dibanding kelompok kontrol, namun menurut hasil statistik peningkatan tersebut tidak bermakna ($p > 0,05$). Peningkatan konsentrasi protein total medium kultur pada penelitian ini diduga berhubungan dengan metabolisme sel yaitu, pelepasan protein oleh sel pulpa yang mengalami lisis dan sekresi protein yang dihasilkan oleh sel yang masih hidup.⁴³ Apabila sel mengalami cedera dan lisis, maka komponen-komponen sitoplasma akan terlepas ke cairan ekstraselular (medium kultur) sehingga protein total medium kultur meningkat.²³ Selain itu, pada kematian sel melalui proses apoptosis, protein-protein intraseluler seperti *caspases* bersama dengan *lactate dehydrogenase* (LDH) akan terlepas ke medium kultur. *Caspases* adalah protein intraseluler yang berperan sebagai mediator apoptosis.⁴⁴ Sedangkan, LDH merupakan enzim sitoplasmik yang tersebar luas dalam jaringan terutama berlimpah di mitokondria.⁴⁵ Kehadiran LDH mencerminkan cedera sel yang parah, kematian sel, dan penurunan integritas membran sel.⁴⁶ Konsentrasi LDH akan meningkat bila suatu jaringan mengalami cedera.⁴⁵ Namun, pada penelitian ini tidak dilakukan pemeriksaan keberadaan LDH dan *caspase* dalam medium kultur sehubungan dengan paparan TEGDMA.

Peningkatan konsentrasi protein total medium kultur juga dapat berhubungan dengan aktivitas sel. Aktivitas sel memerlukan nutrisi yang dapat diperoleh dari protein yang terkandung dalam medium kultur. Kematian sel akan

menyebabkan tidak adanya aktivitas selular sehingga pemakaian protein medium kultur berkurang.²⁷ Di lain sisi, apabila sel tetap hidup, sel akan terus melakukan sintesis dan mensekresi beberapa protein yang mencerminkan aktivitasnya. Beberapa protein yang disintesis didalam sel akan disekresikan ke medium kultur. Seperti yang terjadi pada saat infeksi atau cedera, sel akan mensekresi protein ke dalam medium kultur sebagai respon inflamasi, salah satunya adalah sitokin.⁴⁷

Bedasarkan hal tersebut diatas, peningkatan konsentrasi protein total medium kultur sel pulpa dapat menjadi indikator terjadinya kematian sel, cedera sel yang parah, penurunan integritas membran sel, atau inflamasi sel pulpa. Sehingga diduga TEGDMA 4 mM, 8 mM, dan 12 mM menyebabkan kematian sel pulpa. Mekanisme TEGDMA dalam menyebabkan kematian sel pulpa diperkirakan berhubungan dengan penurunan *glutation intraselular* (GSH). Engelman dkk, melaporkan bahwa apoptosis sel akibat TEGDMA disebabkan oleh penurunan GSH oleh TEGDMA. GSH berperan dalam detoksifikasi sel, sehingga penurunan ini akan mengakibatkan kematian sel.⁴⁸ Schweikl dkk juga melaporkan bahwa penurunan GSH dapat meningkatkan kadar *reactive oxygen species* (ROS), sehingga dapat menyebabkan apoptosis.⁶ Hal ini seperti yang dilaporkan pada hasil penelitian Pardamean R A S dan Tanaya S (belum dipublikasikan).^{49,51}

Hasil ini bertentangan dengan penelitian sebelumnya oleh Dhamma Ranti dkk, yang melaporkan bahwa TEGDMA menimbulkan efek toksik terhadap kultur sel-sel pulpa gigi yang ditunjukkan dengan penurunan konsentrasi total protein medium kultur. Perbedaan hasil ini diduga karena perbedaan sampel yang digunakan dalam penelitian. Pada penelitian sebelumnya sampel yang digunakan adalah kultur primer sel pulpa gigi, sedangkan sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah subkultur.²⁰

Selanjutnya, untuk memperoleh gambaran profil protein medium kultur sel pulpa gigi dengan metode SDS PAGE, pada penelitian ini dilakukan dua tahap pewarnaan (*double staining*) dengan menggunakan *Coomassie blue* dan *Silver stain*. Pada umumnya pewarnaan dapat dilakukan satu tahap dengan *Coomassie blue*, namun pada penelitian ini gambaran *band-band* protein kurang memperlihatkan separasi yang jelas sehingga pewarnaan kedua dengan *silver*

dilakukan untuk meningkatkan sensitivitas hingga 50-100 kali lipat.³⁶ Setelah pewarnaan kedua dengan silver tampak *band-band* protein dengan berat molekul rendah yang lebih jelas.

Hasil tampilan profil protein medium kultur pada gel elektroforesis memperlihatkan perbedaan gambaran profil protein antara kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan dan antara kelompok perlakuan. Secara keseluruhan, banyak terdapat gambaran *band-band* protein dengan berbagai berat molekul baik pada kelompok perlakuan maupun kelompok kontrol, namun gambaran *band-band* protein tersebut kurang jelas. *Band* protein pada kelompok kontrol dan perlakuan dengan berat molekul pada rentang 45 kDa – 61 kDa mengalami penebalan *band* seiring dengan peningkatan konsentrasi TEGDMA 4 mM, 8 mM, dan 12 mM. Protein yang memiliki berat molekul terdekat antara lain *Fetal Bovine Serum* (FBS) dengan berat molekul 48,4 kDa. Sehingga dugaan pertama adalah terdapat kemungkinan protein dengan berat molekul pada rentang 45 kDa – 61 kDa tersebut adalah protein-protein yang terkandung dalam medium kultur yang dibutuhkan oleh sel untuk aktivitasnya. Dugaan lainnya adalah merupakan produk protein yang disekresikan oleh sel atau merupakan penumpukan *band* dengan berat molekul yang berbeda yang tidak terseparasi dengan baik. Untuk mengidentifikasi *band-band* protein yang mengalami penumpukan, dapat diperjelas dengan menggunakan teknik SDS PAGE 2-dimensi atau dengan menggunakan *marker antibody* spesifik.

Penebalan *band* protein pada berat molekul dengan rentang 22 kDa – 26 kDa pada kelompok perlakuan TEGDMA 12 mM, diduga merupakan produk sekresi protein sel pulpa sebagai respon terhadap inflamasi, misalnya sitokin. Pada penelitian sebelumnya oleh Schmalz G, dilaporkan terjadi pelepasan molekul proinflamatori yaitu interleukin 6 (IL-6) setelah pemaparan TEGDMA terhadap kultur epitel rongga mulut manusia. Pada penelitian tersebut dikatakan bahwa pemaparan TEGDMA dapat menyebabkan peningkatan ekspresi IL-6 menjadi lima kali lipat.⁵⁰ Diketahui IL-6 merupakan protein dengan berat molekul 24 kDa yang dapat ditemukan pada medium sebagai respon sel terhadap infeksi dan cedera. IL-6 diproduksi oleh fibroblas, sel T aktif, monosit atau makrofag aktif, dan sel endotelial.⁴⁷ Dari hasil penelitian sebelumnya oleh Schmalz G, dapat

diasumsikan bahwa kemungkinan profil protein dengan rentang 22 kDa – 26 kDa pada kelompok perlakuan TEGDMA 12 mM berasal dari IL-6 yang disekresikan oleh sel sebagai respon terhadap inflamasi.

Hal lain yang ditemukan adalah penipisan *band* protein pada kelompok kontrol dengan berat molekul rendah kisaran 6 kDa seiring dengan peningkatan konsentrasi TEGDMA 4 mM, 8 mM, dan 12 mM. Penipisan *band* protein dengan berat molekul 6 kDa tersebut diduga merupakan protein pada medium kultur yang diperlukan oleh sel dalam merespon tekanan (TEGDMA). Namun, pada penelitian ini tidak dilakukan identifikasi lebih lanjut mengenai jenis protein tersebut, sehingga dibutuhkan penelitian lebih lanjut dengan menggunakan *marker antibody* spesifik.

